ANTIGEN-REZEPTOREN AUF MAUS T-LYMPHOZYTEN

Versuch einer biochemischen und funktionellen Analyse mit Hilfe von Antikörpern gegen IgM-Determinanten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Franz Walter Birke
aus Rothenstadt

1980

ANTIGEN-REZEPTOREN AUF MAUS T-LYMPHOZYTEN

Versuch einer biochemischen und funktionellen Analyse mit Hilfe von Antikörpern gegen IgM-Determinanten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Franz Walter Birke
aus Rothenstadt

1980

Tag der mündlichen Prüfung: 23. April 1980

Dekan: Prof. Dr. M. Hanack

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Riethmüller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Hagenmaier

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (07472) 22145

Die Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Riethmüller in der Abteilung für experimentelle Chirurgie und Immunologie der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen begonnen und am Institut für Immunologie der Universität München abgeschlossen.

Herrn Priv. Doz. Dr. E.P. Rieber danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Diskussion der Versuche.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. M. Hadam für viele wertvolle Anregungen.

Frau R. Inan, Frau A. Kleinschmidt und Frau L. Hancok bin ich für die engagierte Hilfe bei der Durchführung der zellulären Experimente zu Dank verpflichtet.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe möchte ich für ihre Unterstützung und Zusammenarbeit danken.

Herrn Prof. Dr. G. Riethmüller gebührt mein Dank für die Anregungen zur Bearbeitung des Promotionsthemas und für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Meiner Frau möchte ich besonders für ihre Unterstützung und Rücksichtnahme danken.

Meinen Eltern

A b s t r a c t

BIRKE, FRANZ:

ANTIGEN-REZEPTOREN AUF MAUS T-LYMPHOZYTEN.
VERSUCH EINER BIOCHEMISCHEN UND FUNKTIONELLEN ANALYSE MIT HILFE VON ANTIKÖRPERN GEGEN IgM-DETERMINANTEN

Hühner- und Kaninchen-Antiseren wurden gegen Maus Serum IgM, µ-Ketten und Fdµ-Fragmente induziert. Um Kreuzreaktionen über gemeinsame Kohlenhydratanteile von IgM und Zelloberflächen-Molekülen zu vermeiden, wurden zur Immunisierung auch Perjodat-oxidierte Antigene eingesetzt. Gereinigte Antikörper (AK) wurden affinitätschromatographisch an insolubilisiertem IgM präpariert und µ-spezifisch gemacht durch Absorption mit Maus-IgG und Maus-Serumproteinen.
Mit den Kaninchen-Anti IgM-AK konnte in der Zyto-Radioautographie keine Reaktion mit T-Lymphozyten der Maus gefunden werden, während in Hühnern induzierte Anti IgM- und Anti-µ-AK an etwa 60 % der T-Zellen gebunden wurden.
In der indirekten Immunfluoreszenz färbten gereinigte Hühner Anti-µ-AK und Anti Fdµ-AK sowohl die meisten B-Lymphozyten als auch 60 - 90 % der T-Lymphozyten an.
Nach Laktoperoxidase-Oberflächenjodierung und Detergens-Lyse von peripheren T-Lymphozyten, Thymozyten und MLC-induzierten T-Blasten sowie Zellen der T-Lymphomlinie WEHI 22 konnte mit Hühner Anti-µ- und Anti Fdµ-AK ein Molekül präzipitiert werden, das aus zwei Ketten mit Molekulargewichten von 70 000 d und 25 000 d aufgebaut ist.
Eine mögliche Rezeptor-Funktion dieser Oberflächen-Struktur wurde in Experimenten zur Inhibition der Alloantigen-Erkennung in der gemischten Lymphozytenkultur (MLC) und in der zellvermittelten Zytotoxizität (CMC) getestet. In beiden Systemen konnten Inhibitionseffekte mit gereinigten Hühner-AK spezifisch für Maus IgM (MLC: 75 %, CMC: 90 % Inhibition) und mit µ-Spezifität (MLC: 75 %, CMC: 45 % Inhibition) demonstriert werden.
Die Herkunft dieser T-Zell-Oberflächenmoleküle bleibt unklar, obwohl der Nachweis dieser Moleküle auf in vitro kultivierten T-Lymphomzellen zusammen mit dem von Serum-Immunglobulinen abweichenden Molekulargewicht der schweren Kette auf eine endogene Synthese hindeuten.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	E I N L E I T U N G	1
II.	M A T E R I A L U N D M E T H O D E N	11
1.	Chemikalien und Proteine	11
2.	Geräte	12
3.	Herstellung einer Kaninchen Anti Maus-μ-Ketten Säule	16
3.1.	Isolierung von IgM aus dem Aszites von IgM104E-Myelom-Mäusen	16
3.1.1.	Pevikon Elektrophorese	16
3.1.2.	Gelchromatographie mit Sepharose 6B	16
3.1.3.	Proteinbestimmung nach Lowry (modifiziert)	17
3.1.4.	Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony	17
3.1.5.	Immunelektrophorese nach Schneidegger	18
3.1.6.	Analytische SDS-Diskelektrophorese	19
3.1.7.	Molekulargewichtsbestimmung	23
3.2.	Immunisierung von Kaninchen mit IgM104E	23
3.3.	Präparation von gereinigten, Anti-μ-Kette spezifischen Antikörpern	24
3.4.	Kupplung an Sepharose	24
4.	Isolierung von Normalem Maus IgM (polyclonales IgM) aus Normalem Maus Serum (NMS)	27
4.1.	Reinigung mittels Affinitätschromatographie	27
4.1.1.	Gewinnung von Mausserum (NMS)	27
4.1.2.	Entfernung von Albumin aus Mausserum mit Hilfe von "Blue Sepharose"	27
4.1.3.	Entfernung von IgG aus Mausserum mit Hilfe von Protein A	28
4.1.4.	Isolierung von polyclonalem IgM (IgM p.c.) auf der Kaninchen Anti-μ-Säule	28

Seite

4.1.5. Weiterreinigung von affinitätschromatographisch präpariertem IgM p.c. mittels Säulenchromatographie an "Sepharose G150 superfine" 29

4.1.6. Densitometrische Analyse von SDS-Disc-PAGE-Gelen 29

4.2. Reinigung von Normalem Maus IgM mit "klassischen" Methoden 29

4.2.1. AcA34-Chromatographie 29

4.2.2. Pevicon-Elektrophorese 30

5. Gewinnung von Antiseren gegen IgM p.c. 30

5.1. Kaninchen 30

5.2. Schaf 31

5.3. Hühner 31

6. Isolierung von gereinigten Antikörper-Fraktionen aus Anti-IgM-Antiserum 32

6.1. Präparation von Immunglobulin-angereicheten Fraktionen durch Fällung mit Neutralsalzen 32

6.1.1. Ammoniumsulfat-Fällung bei Kaninchenantiseren 32

6.1.2. Natriumsulfat-Fällung bei Hühnerantiseren 32

6.2. Präparation gereinigter Anti-μ-Ketten spezifischer Antikörper mittels Affinitätschromatographie 33

6.2.1. Kaninchen-Antikörper 33

6.2.2. Hühner-Antikörper 34

7. Gewinnung von Kontrollseren 34

7.1. Kaninchen-Antiseren 35

7.2. Hühner-Antiseren 35

8. Gewinnung von gereinigten Antikörpern als Kontroll-Antikörper 35

9. Absorption von Antiseren und von gereinigten Antikörpern mit vitalen Zellen 36

9.1. Zellen 36

9.1.1. Schaf-Erythrozyten 36

9.1.2. Maus-Erythrozyten 36

9.1.3. P815-Mastozytomzellen der Maus 37

9.1.4. Tuberkelbakterien (BCG) 38

Seite

13.4.2. Lyse der Erythrozyten mit Ammoniumchlorid 50

13.4.3. Charakterisierung der peripheren T-Zellen 50

13.5. Milzzellen von nackten Mäusen 51

13.6. T-Lymphom-Zellen der Linien WEHI 7 und WEHI 22 51

13.7. MLC-Blasten 51

14. Der Trypanblau-Test 52

15. Indirekte Immunfluoreszene (IF) 53

15.1. Technik der indirekten IF 53

15.2. Präparation des TRITC-Kaninchen $F(ab')_2$-Anti-Hühner-Ig-Antikörpers 54

15.2.1. Isolierung des Kaninchen-Anti-Hühner-Ig-Antikörpers 54

15.2.2. Pepsin-Verdauung zur Herstellung des $F(ab')_2$-Fragments 54

15.2.3. Reinigung von K-$F(ab')_2$-Fragmenten mit Protein A 55

15.2.4. Konjugation von K-$F(ab')_2$ α Hühner-Ig mit Tetramethyl-Rhodamin-Isothiozyanat (TRITC) 55

16. Zyto-Radioautographie (RAG) 56

16.1. Chloramin-T-Jodierung gereinigter Antikörper 56

16.2. Durchführung der RAG 57

17. Immunpräzipitation I-125-markierter Zelloberflächen-Proteine und deren Analyse in der SDS-Disc-Polyacrylamid-gelelektrophorese 58

17.1. Laktoperoxidase (LPO) katalysierte Jodierung vitaler Zellen mit I-125 58

17.1.1. Reinigung der Laktoperoxidase 58

17.1.2. Durchführung der Jodierung mit Laktoperoxidase 61

17.2. Solubilisierung der markierten Membran-Proteine 62

17.3. TCA-Präzipitation markierter Proteine 63

17.4. Immunpräzipitation der radiojodierten Zelloberflächenstrukturen 63

17.4.1. Co-Präzipitation mit zweiten Antikörper 64

		Seite
9.2.	Absorption	38
9.2.1.	Absorption von kompletten Antiseren	38
9.2.2.	Absorption von gereinigten Antikörpern	38
10.	Herstellung von Antiseren gegen μ-Ketten und μ-Ketten-Fragmente	39
10.1.	Isolierung von μ-Ketten aus polyclonalem IgM mittels präparativer SDS-Disc-PAGE	39
10.1.1.	Präparative SDS-Disc-PAGE mit kontinuierlicher Elution	39
10.1.2.	Präparative SDS-Disc-PAGE mit diskontinuierlicher elektrophoretischer Elution und Adsorption an Hydroxylapatit	40
10.2.	Entfernung von SDS aus SDS-Protein-Komplexen mittels Dowex-Ionenaustauscher	41
10.3.	Isolierung von Maus-μ-Ketten-Fragmenten	43
10.3.1.	Partielle Reduktion von IgM104E	43
10.3.2.	Papainverdauung von partiell reduziertem IgM104E	43
10.3.3.	Charakterisierung der Spaltprodukte	44
10.3.4.	Isolierung der "Fdμ" - Fragmente durch präparative SDS-Disc-PAGE	44
10.4.	Perjodatoxidation der IgM-Fragmente	45
10.5.	Farbtest auf Gesamthexosen und -pentosen nach Dubois	45
10.6.	Herstellung von Hühner-Antiseren gegen IgM-Fragmente	
11.	Affinitätschromatographische Reinigung von Hühner Anti IgM-Fragment-Antikörpern	46
12.	Titerbestimmung der Antiseren durch "Passive Hämagglutination" (PA)	46
12.1.	Kupplung von polyclonalem M-IgM an SRBC mit Chrom-III-Chlorid	46
12.2.	Durchführung des Tests	47
13.	Präparation und Charakterisierung der verwendeten Zell-Populationen	48
13.1.	Lymphknotenzellen	48
13.2.	Thymuszellen	48
13.3.	Milzzellen	49
13.4.	Periphere T-Zellen	49
13.4.1.	Nylon-Wolle-Absorption	49

Seite

17.4.2. Zusätzliche Präzipitation mit Staphylococcus aureus (Staph. A.) 64

17.5. Analyse der Präzipitate mit SDS-Disc-PAGE in Röhrchengelen mit anschließenem "Schneiden" der Gele 65

17.6. Analyse der Präzipitate mit SDS-Disc-PAGE in Flachgelen mittels Radioautographie (Fluorographie) 66

17.7. Chloramin T-Jodierung von Marker-Proteinen 66

18. Die gemischte Lymphozyten-Kultur (MLC = mixed lymphocyte culture) 67

18.1. MLC-Medium 67

18.2. Zellen 68

18.2.1. Stimulatorzellen (DBA/2) 68

18.2.2. Vorinkubation der Responderzellen (C57bl/6) mit Antiserum bzw. daraus isolierten Antikörpern 69

18.2.3. Durchführung der MLC (C57bl → DBA) 69

18.2.4. Testansätze und Kontrollen 70

18.2.5. Auswertung der MLC 71

19. Komplement-Lyse Antikörper-beladener Lymphozyten (Mikroansatz) 71

20. Der zellvermittelte Zytotoxizitätstest (C M C) 73

20.1. Die präparative, gemischte Lymphozytenkultur (MLC) zur Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten 73

20.2. Durchführung des zellvermittelten Zytotoxizitätstests 74

20.2.1. Chromieren der DBA/P815-Zielzellen 74

20.2.2. Vorinkubation der zytotoxischen Zellen ohne Komplement 74

20.2.3. Vorinkubation der zytotoxischen Zellen mit Komplement 75

20.2.4. Auswertung des Versuchs 76

Seite

III. E R G E B N I S S E

1.	Präparation von Maus-IgM aus Normalem Maus Serum (NMS)	77
1.1.	Reinigung von Maus-IgM aus dem Aszites von IgM104E Myelom-Mäusen	77
1.2.	Herstellung von Kaninchen-Antiseren gegen IgM104E und Präparation von μ-Ketten spezifischer "Antikörper"	80
1.3.	Isolierung von Maus IgM aus normalem Maus Serum	81
1.3.1.	Reinigung mittels Affinitäts-chromatographie	81
1.3.2.	Reinigung von IgM mittels "klassischer" Methoden	87
2.	Herstellung von Antiseren und gereinigten Antikörpern gegen polyklonales Maus IgM in Kaninchen und Hühnern	88
2.1.	Charakterisierung der Antikörper	88
2.2.	Isolierung der γ-Globulin-Fraktionen der Kaninchen- und Hühner-Antiseren gegen Maus IgM p.c. durch Fällung mit Neutralsalzen	89
2.3.	Affinitätschromatographische Reinigung von Anti-μ-Antikörpern aus Kaninchen- und Hühner-Anti IgM p.c.-Antiseren	91
3.	Herstellung von Hühner-Antiseren gegen isolierte μ-Ketten und Fdμ-Fragmente	92
3.1.	Präparation der μ-Ketten aus poly-klonalem Maus IgM	92
3.2.	Präparation der Fdμ-Fragmente aus dem Papain-Verdauungsgemisch von Maus IgM104E	94
3.2.1.	Partielle Reduktion von IgM104E	94
3.2.2.	Papain-Verdauung von partiell reduziertem IgM104E und Analyse der Verdauungsprodukte	96
3.2.3.	Isolierung der Fdμ-Fragmente	106
3.2.4.	Perjodat-Oxidation der isolierten IgM-Fragmente	106
3.2.5.	Charakterisierung der Hühner-Antiseren gegen μ-Ketten und Fdμ-Fragmente	109

Seite

4. Immun-Radioautographische Analyse der Bindung von Kaninchen- und Hühner-Anti μ-Antikörpern auf Maus-Lymphozyten 111

5. Indirekte Immunfluoreszenz mit Hühner-Antiseren und gereinigten Antikörpern 112

5.1. Optimierung der Konzentration des ersten Antikörpers 113

5.2. Optimierung der Konzentration des zweiten Antikörpers 113

5.3. Ergebnisse der IF-Bindungsstudien von Hühner-Anti-IgM Seren und daraus isolierten Anti-μ-spezifischen Antikörpern 115

5.4. Bindung von Hühner Antiseren gegen isolierte μ-Ketten, Fdμ26000 und Fdμ43000 in der indirekten Immunfluoreszenz 118

5.5. Charakterisierung der T-Zell Population aus Milz-Zellen nach Filtration über Nylon-Wolle 121

6. Analyse der radiojodierten Lymphozyten-Oberflächenproteine 122

6.1. Optimierung der Laktoperoxidase katalysierten Jodierung 123

6.2. Immunpräzipitation der Lysate radiojodierter Maus-Lymphozyten 126

6.3. Analyse der Immun-Präzipitate mit Hilfe der SDS-Disc-PAGE 133

6.3.1. Analyse der Präzipitate von Maus-B-Zellen mit Hühner αIgM p.c.-Antiserum und Hühner αμ-Antikörpern in 10 % Polyacrylamidgelen unter reduzierenden Bedingungen 133

6.3.2. Analyse der Präzipitate verschiedener Populationen von Maus-T-Lymphozyten mit gereinigten Hühner Anti-μ-Antikörpern 135

6.3.2.1 Präzipitate von Lysaten aus peripheren T-Lymphozyten 136

6.3.2.2 Präzipitate aus Thymozyten-Lysaten 140

6.3.2.3 Präzipitate aus Lysaten von T-Lymphom-Zellen WEHI 22 141

6.3.2.4 Präzipitate aus MLC-Blasten-Lysaten 141

6.3.3. Analyse der Präzipitate verschiedener Maus-T-Lymphozyten Populationen mit gereinigten Antikörpern gegen isolierte, Perjodat-oxidierte Fdμ26000-Fragmente 143

Seite

6.3.3.1 Präzipitate von Lysaten radiojodierter B-Lymphozyten 143

6.3.3.2 Analyse der T-Lymphozyten-Lysate 144

6.3.4. Analyse der Immunpräzipitate von Lysaten peripherer T-Zellen in SDS-Disc-Gelen unter nicht-reduzierenden Bedingungen 146

7. Versuche zur Inhibition der gemischten Lymphozytenkultur (MLC) mit Hühner- und Kaninchen-Antiseren 148

7.1. Effekt von Hühner-Anti-IgM-Antiserum und daraus gereinigter, μ-spezifischer Antikörper auf die MLC (C57bl → DBA) 149

8. Versuche zur Inhibition der zellvermittelten Zytotoxizität (CMC) mit Hühner Anti-μ- und Anti Fdμ-Antikörpern 151

8.1. Effekt von Hühner Anti IgM-Antiserum und daraus affinitätschromatographisch gereinigten Antikörpern 153

8.2. Effekt von Hühner-Anti-IgM-Fragment-Antiseren und gereinigten Antikörpern 155

IV. D I S K U S S I O N

1. Vergleich affinitätschromatographischer und "klassischer" Trenn-Methoden zur Gewinnung von Maus-IgM aus normalem Maus Serum 157

2. Vergleich der Antikörper-Aktivitäten in verschiedenen Hühner-Antiseren 159

3. Nachweis der Bindung von Anti IgM-Antikörpern auf Maus-Lymphozyten in Immun-Radioautographie und Immunfluoreszenz 160

4. Bindung von Anti IgM-Fragment Antikörpern auf Maus Lymphozyten in der indirekten Immunfluoreszenz 163

4.1. Induktion von Anti-V_H-Antikörpern durch Immunisierung mit Fdμ-Fragmenten 164

4.2. Neue Antigendeterminanten auf isolierten μ-Ketten 166

4.3. Überlegungen zur Frage der Kontamination der verwendeten Antigene 167

Seite

4.4. Kreuzreagierende Kohlenhydrat-Determinanten 168

5. Analyse von Immunpräzipitaten aus den Lysaten radiojodierter Lymphozyten der Maus 170

5.1. Die Natur der zusätzlichen Bande bei 40 - 45 000 d 174

5.2. Herkunft der präzipitierten Oberflächenmoleküle von T-Lymphozyten 175

6. MLC-Inhibitionsversuche mit Hühner- und Kaninchen-Antiseren und gereinigten Antikörpern 178

7. CML-Inhibitionsversuche mit Hühner-Antiseren und gereinigten Antikörpern gegen Maus IgM und IgM-Fragmente 181

V. Z U S A M M E N F A S S U N G 185

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S 188

A B K Ü R Z U N G E N

AG	Antigen
AK	Antikörper
BSA	Bovines Serum Albumin
CFA	Komplettes Freund's Adjuvant
C_H	Konstanter Teil/Domäne der schweren Kette von Immunglobulinen
CMC, CML	cell mediated cytotoxicity bzw. lysis zellvermittelter Zytotoxizitätstest
cpm	counts per minute
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
FKS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
H-Kette	heavy chain, schwere Kette der Immunglobuline
Hü	Hühner
ID	Doppelte radiale Immuno-Diffusion nach Ouchterlony
IE	Immunelektrophorese
Ig	Immunglobuline
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IgA	Immunglobulin A
IgM p.c.	polyclonales IgM, aus Normalem Maus Serum
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
L-Kette	light chain, leichte Kette der Immunglobuline
LPO	Laktoperoxidase

MLC, MLR	mixed lymphocyte culture bzw. reaction, gemischte Lymphozytenkultur bzw. -reaktion
NET	NaCl-, EDTA-, Tris-Puffer
NKIgG	Normales Kaninchen-IgG
NMS	Normales Maus-Serum
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
s.c.	subcutan
SDS-Disc-PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese in SDS mit diskontinuierlichem Puffer-System
PBS	Phosphat-gepufferte isotonische Kochsalzlösung
PBS/Azid	PBS mit 0.02 % Natriumazid
RAG	Radioautographie
SDS	Natriumdodecylsulfat
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiozyanat
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V_H	Variabler Teil/Domäne der schweren Kette von Immunglobulinen
V_L	Variabler Teil/Domäne der leichten Kette von Immunglobulinen

I. EINLEITUNG

Eine zentrale Funktion des Immunsystems ist die spezifische Erkennung von Antigenstrukturen. Sie erfolgt durch eine große Vielfalt von Rezeptormolekülen mit unterschiedlicher Bindungsspezifität. Solche Rezeptorstrukturen findet man sowohl auf der Oberfläche immunkompetenter Lymphozyten als auch auf zirkulierenden Immunglobulinmolekülen.

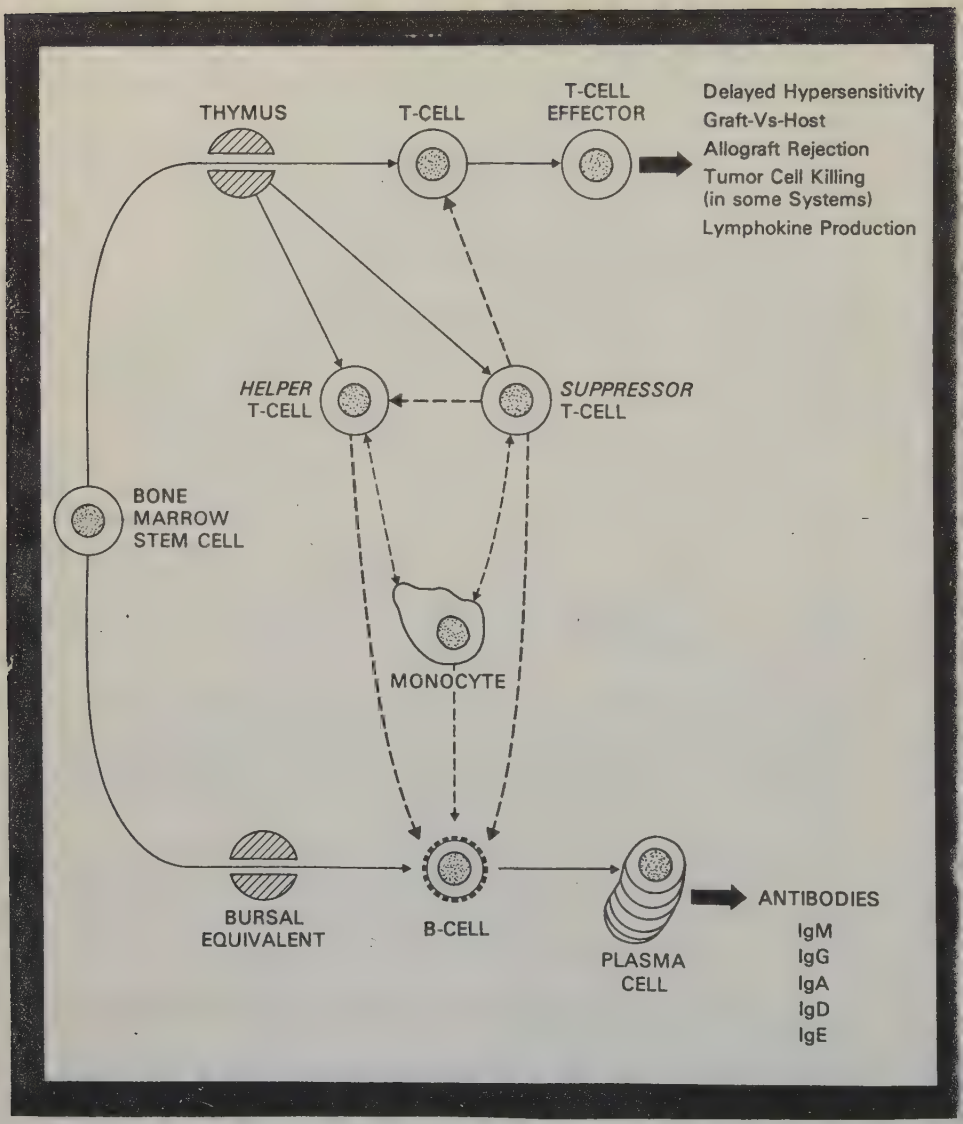
Man kennt zwei Hauptklassen von Lymphozyten, die sich in ihrer Funktion grundsätzlich unterscheiden: Die B-Lymphozyten (Bursa fabricii oder bone marrow geprägt), verantwortlich für die Synthese der zirkulierenden Antikörper, und die T-Lymphozyten (Thymus geprägt), die zuständig sind für die zellvermittelte Immunität. Zusätzlich kommt dieser Lymphozytenklasse noch eine zentrale Rolle bei der Regulation der Immunantwort zu, da sie diese sowohl als "Helfer-T-Zellen" stimulieren, als auch in Form von "Suppressor-T-Zellen" hemmen können. Diese regulatorische Funktion kann antigenspezifisch und unspezifisch erfolgen.

Für das Verständnis der Immunfunktion, vor allem im Hinblick auf ihre gezielte, d.h. therapeutisch einsetzbare Modulation, ist die Kenntnis der Natur der Erkennungsstrukturen von grundlegender Bedeutung.

Obwohl Immunologen das Problem der Antigenerkennung seit 1900 als essentiell erkannt haben (1), wurden erst in den letzten 10 Jahren weitergehende Informationen für die Eigenschaften der Lymphozyten-Rezeptoren erhalten.

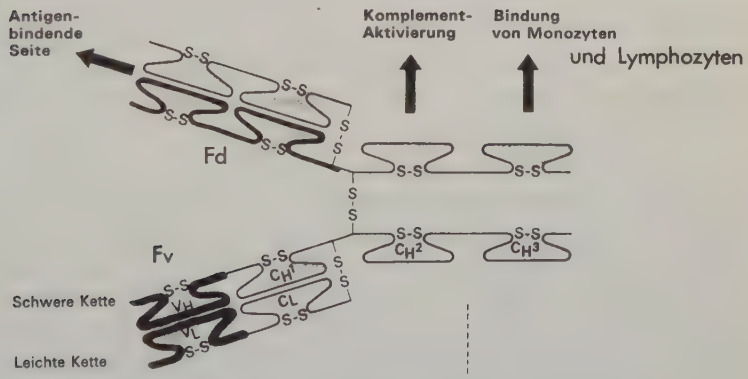
Welche molekularen Eigenschaften haben nun die Antigen-Rezeptoren des Immunsystems?

Für B-Lymphozyten, den Vorläufern der Antikörper sezernierenden Plasmazellen, können Immunglobuline als funktionelle Antigenrezeptoren als gesichert angesehen werden (5,6). Sie entsprechen im Aufbau den zirkulierenden Immunglobulin-Molekülen.



Modell der Lymphozyten-Differenzierung nach BRODER et al. (J. Natl. Cancer Inst. 61, 1 Titelblatt, 1976)

Diese Antikörpermoleküle sind aus schweren oder H- (Heavy chain) und leichten oder L- (Light chain) Polypeptidketten aufgebaut. Sie lassen sich auf der Basis der Aminosäuresequenz ihrer drei (IgG, IgA, IgD, IgE) oder vier (IgM) konstanten Teile (Domänen) der schweren Kette (C_H) klassifizieren (Isotypen). Bei den leichten Ketten unterscheidet man ebenfalls auf Grund der Aminosäurensequenz zwei Klassen, den Kappa (κ)-Typ und den Lambda (λ)-Typ. Zusätzlich besitzt jede Kette eines Antikörpermoleküls für die Antigenbindung einen variablen Teil (V_H, V_L), der sie von den anderen Mitgliedern ihrer Klasse unterscheidet. Die Bindungsspezifität des Antikörpermoleküls ist im allgemeinen durch die variablen Teile je einer leichten und einer schweren Kette definiert.



Modell eines IgG-Moleküls
ROITT, J., in "Essential Immunology", 1978

Auf molekularem Niveau sind die variablen Domänen gut definiert (2), sie bilden den Fv-Teil des Antikörpermoleküls (3). Die strukturelle Unterteilung der Antikörpermoleküle in konstante und variable Domänen spiegelt sich auch auf der genetischen Ebene wider, wo verschiedene Gene, genannt V- und C-Gene, für den variablen und die konstanten Teile der Polypeptidkette codieren. Diese Gene liegen in drei

nichtgekoppelten Gruppierungen im Genom, der Schweren-Kette Kopplungsgruppe und den Kopplungsgruppen für die κ und λ leichten Ketten (4). Jede dieser Kopplungsgruppen besteht aus einer Serie von V- und C-Genen. Es müssen somatische chromosomale Verschiebungen während der Differenzierung der B-Lymphozyten angenommen werden, um die Synthese kompletter Antikörpermoleküle zu ermöglichen (69,130). Jeder individuelle B-Lymphozyt ist charakterisiert durch die Spezifität seiner Rezeptoren, bestimmt durch die variablen Teile der schweren und leichten Kette.

Auf der Oberfläche von B-Lymphozyten findet man alle Ig-Klassen, die sich als sezernierte Antikörper im Serum nachweisen lassen. So wurden Membran-Immunglobulin M (mIgM), strukturell ein Monomeres des pentameren Serum-IgM (7,8), Membran-IgG, Membran-IgA sowie Membran-IgD beschrieben (10,11,12).

Das bedeutet, daß es unabhängig von Thymus und Antigen (15) in der Ontogenese der B-Lymphozyten nacheinander zur Verknüpfung eines V_H-Gens mit verschiedenen V_C-Genen kommt (13). Dabei können gleichzeitig bis zu drei Ig-Klassen (Isotypen) mit gleicher Spezifität, d.h. gleichem V_H-Genprodukt, auf der Zelloberfläche exprimiert sein (139).

Membran-IgM kann als erstes Ig-Molekül auf Lymphozyten nachgewiesen werden und ist über weite Strecken der Entwicklung vorhanden, sogar noch auf Zellen, die nach Antigenkontakt bereits eine andere Ig-Klasse sezernieren (16). Damit scheint dem mIgM eine zentrale Rolle als Antigenrezeptor auf B-Lymphozyten zuzukommen.

Viel weniger ist bekannt über die Biochemie des Antigenrezeptors auf T-Lymphozyten.
In Hinblick auf die vergleichbare Antigenspezifität von B- und T-Lymphozyten (19) und in leicht demonstrierbaren Membran-Immunglobulinen auf B-Zellen ist es naheliegend, auch auf T-Lymphozyten Immunglobuline als Rezeptoren anzunehmen. Doch führten Versuche, mit konventionellen Anti-Ig-Antikörpern Immunglobuline auf T-Zellen nachzuweisen, zu sehr widersprüchlichen Ergebnissen.

Von verschiedenen Autoren wurden in Immunfluoreszenz-Tests (20,21,22,27) und Autoradiographie (23-26) Immunglobuline auf T-Lymphozyten von Mensch, Maus, Kaninchen, Schaf, Schwein und Huhn beschrieben. Auch elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Bindung virus-gekoppelter Anti-Ig-Antikörper auf T-Zellen (28) sowie die Lyse von T-Lymphozyten(Zytotoxizität durch polyklonale Anti-IgM-Antikörper mit Hilfe von Komplement)(29) wiesen auf T-Zell-Ig hin. Weiterhin läßt sich die von einigen Autoren gefundene gleiche Bindungskapazität für Antigen von B- und T-Zellen unter Sättigungsbedingungen im Sinn von T-Zellen deuten (17). Schließlich gelang es, Immunglobulin aus radiojodierten normalen oder neoplastischen T-Zell-Membranen zu isolieren durch Aufschluß der Zellen in Harnstoff/Essigsäure (30-33), in Harnstoff/1 % NP-40 (34,35,38) oder durch metabolische Abgabe von Membran-Ig-Molekülen (36,37) und nachfolgender Präzipitation mit Anti-Ig- oder Anti-L-Ketten-Seren.

Trotz Verwendung der gleichen Methodik waren jedoch eine Reihe anderer Arbeitsgruppen (zusammengefaßt in 5,6,39,40, 10,48) nicht in der Lage, diese Ergebnisse zu reproduzieren. Es war auch nicht möglich, variable Regionen von Kappa-Ketten auf T-Zellen zu entdecken unter Bedingungen, die es auf B-Zellen gestatteten (18). Das wurde zum Teil auf schnelles "Shedding" der Rezeptoren unter in vitro Bedingungen oder auf die geringe Dichte der T-Zell-Immunglobuline zurückgeführt, zum Teil auf eine besondere Verankerung der Ig-Moleküle in der Membran, die eine Reaktion mit Anti-Ig-Seren verhindert (Glykocalix der Zelloberfläche, C-Domänen sind Membran-gebunden). Auch können geringe Unterschiede in der Methodik sowie die Spezifität der verwendeten Antiseren und die Reinheit der untersuchten Zellpopulationen für die diskrepanten Daten verantwortlich sein. Schließlich ließen sich die widersprüchlichen Ergebnisse durch die Annahme einer neuen Ig-Klasse auf T-Lymphozyten (IgT) erklären, die im Serum nicht vorkommt. Sie könnte jedoch von einzelnen Antiseren gegen Serum-Immunglobuline über kreuzreagierende Determinanten erkannt werden.

Der Streit um die Immunglobulin-Natur der T-Lymphozyten-Rezeptoren ist somit noch nicht entschieden, wenn auch davon ausgegangen werden kann, daß klassische Immunglobuline auf T-Lymphozyten sicher nicht in vergleichbarer Dichte und Zugänglichkeit wie auf B-Zellen nachzuweisen sind.

Folgende Möglichkeiten für den Aufbau der Antigenrezeptoren auf T-Lymphozyten müssen weiterhin diskutiert werden:

1) Die Antigen-Rezeptoren sind konventionelle Immunglobulinmoleküle, codiert von C- und V-Genen des Antikörpersystems mit behinderter Zugänglichkeit für Anti-Ig-Antikörper.

2) Am Aufbau der Rezeptoren sind nur die für die Spezifität verantwortlichen variablen Teile der Immunglobuline beteiligt. Die konstanten Teile sind ersetzt durch Strukturen, die nicht von Immunglobulin-C-Genen codiert sind.

3) Die Bindungsspezifität ist nicht durch Antikörper-V-Gene codiert, sondern von einem unabhängigen genetischen System.

Hinweise für letztere Annahme, daß ganz andere als klassische Immunglobulin-Gene für den T-Zell-Rezeptor codieren könnten, ergeben sich aus folgenden experimentellen Befunden:
Im Maus-System wurden Faktoren isoliert, die von T-Lymphozyten sezerniert wurden und die Antigene spezifisch binden können. Auf diesen Faktoren, die metabolisch abgegebene Rezeptormoleküle darstellen könnten, ließen sich Strukturen nachweisen, für die Gene im Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC = major histocompatibility complex) codieren (42-51). Diese Gene zeigen keine Kopplung mit Immunglobulin-Genen. Besondere Bedeutung gewinnt diese Beobachtung dadurch, daß diese Gene (IR- oder Immune Response Gene) die Stärke der Immunantwort gegen bestimmte Antigene determinieren. Da auch keine serologische Kreuzreaktionen der T-Zell-Faktoren mit konventionellen Immunglobulinen gefunden wurden (50,48), scheint die Verwendung eines völlig anderen genetischen und molekularen Systems der Antigenerkennung möglich.

Auf der anderen Seite fanden sich vor allem durch Untersuchungen von Eichmann und Rajewsky sowie Binz und Wigzell überzeugende Hinweise für die zweite Möglichkeit, daß derselbe Satz von Immunglobulin-V-Genen für die variable Region der Rezeptormoleküle sowohl auf B- als auch auf T-Zellen verwendet wird.

Diese Autoren gingen von folgenden Überlegungen aus: Teile der Antigenbindungsstelle oder ihrer unmittelbaren Umgebung (= Idiotypen) können als immunogene Determinanten fungieren. Antikörper gegen diese Determinanten werden anti-idiotypische Antikörper genannt (52). Wenn der gleiche Satz von V-Genen für die variablen Teile der B- und T-Rezeptoren codiert, würde folgen, daß B- und T-Lymphozyten, die die gleichen Antigen-Determinanten erkennen, gleiche oder ähnliche Idiotypen tragen müßten. Verschiedene Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Antigensystemen haben dafür zwingende Evidenz erbracht. So konnten Binz und Wigzell zeigen, daß Alloantikörper, in B-Zellen synthetisiert, sehr ähnliche oder gleiche Idiotypen tragen wie die Rezeptoren auf den T-Zellen, die in der Graft-Versus-Host (GVH) Reaktion, der gemischten Lymphozyten-Kultur (MLC) oder in der zytotoxischen Reaktion dieselben Alloantigene erkennen wie Alloantikörper (53-57). Eichmann und Rajewsky fanden, daß anti-idiotypische Antikörper spezifisch sowohl idiotyptragende B-Zellen als auch T-Zellen zu antigen-spezifischen Funktionen anregen konnten. Das weist auf gleiche oder zumindest sehr ähnliche Idiotypen von Antikörper-Molekülen und funktionellen Rezeptoren von T-Helfer- und T-Suppressor-Zellen hin (58).

In beiden Systemen konnte mit Hilfe von allotypischen Markern gezeigt werden, daß die Vererbung der Gene, die für die idiotypischen Determinanten der T-Zellrezeptoren codieren, gekoppelt ist mit den V_H-Genen (59-61). Das bedeutet direkte genetische Evidenz dafür, daß die für die V_H-Region codierenden Gene die Spezifität der Rezeptoren sowohl auf B- als auch auf T-Lymphozyten kontrollieren (62, 63). Mit Hilfe der anti-idiotypischen Antiseren wurden von

T-Lymphozyten stammende, idiotyp-positive, antigen-bindende Moleküle isoliert und vorläufig charakterisiert (64,65). In diesen Untersuchungen wurden auf den von T-Lymphozyten stammenden Rezeptor-Molekülen weder konventionelle klassenspezifische Ig-Determinanten gefunden noch Determinanten, die von MHC gekoppelten Genen codiert werden.

Aus allen bis jetzt dargestellten Daten läßt sich noch kein konsistentes Bild von der molekularen Natur des T-Zell-Rezeptors ableiten.

Der Weg zur Lösung dieses Problems führt nur über die biochemische Charakterisierung der Rezeptormoleküle.

Zur Isolierung größerer Mengen Rezeptormaterials für biochemische Untersuchungen ist es von Vorteil, ein Reagenz zur Verfügung zu haben, das mit den Antigen-Rezeptoren des Hauptteils einer gegebenen Population von T-Zellen reagiert im Gegensatz z.B. zu anti-idiotypischen Antikörpern, die nur mit den wenigen T-Zellen reagieren, die den entsprechenden Idiotyp tragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Versuch unternommen, solche Antiseren zu gewinnen. Da die Daten verschiedener Arbeitsgruppen (37,122) auf eine Strukturanalogie des "IgT" mit monomerem IgM hindeuten und zudem auf B-Lymphozyten Membran-IgM am häufigsten zu finden ist, sollten Antiseren gegen Maus-Serum-IgM und gegen Fragmente hergestellt und ihre Reaktion mit T-Lymphozyten geprüft werden.

Folgende experimentellen Ansätze wurden untersucht:

1) Die bei den bisher für die Untersuchung von Maus-T-Lymphozyten eingesetzten Anti-IgM-Antiseren waren gegen monoklonales IgM, d.h. von einem Klon von Plasmozytom-Zellen sezerniertes IgM gerichtet. Diesen speziellen Molekülen mit nur einem bestimmten variablen Teil könnten Antigen-Determinanten fehlen, die in Hinblick auf eine mögliche Kreuzreaktion mit Membran-Ig auf T-Zellen essentiell sind. Deshab sollte als Antigen für die Herstellung von Anti-IgM-Antiseren IgM aus normalem Maus-Serum, d.h. polyklonales IgM (IgM p.c.) präpariert wer-

den, indem ein großes Spektrum verschiedener variabler Teile repräsentiert ist.

2) Nach Ergebnissen von Cone et al. (122), die auf T-Lymphozyten leichte Ig-Ketten nachweisen, sind diese nicht kovalent an schwere Ig-Ketten Dimere gekoppelt und führen damit möglicherweise zu einer anderen sterischen Konformation der Polypeptidketten als im Serum IgM, wo die L-Ketten kovalent über Disulfid-Brücken an die H-Ketten gebunden sind. Überdies wird eine höhere Hydrophobizität des "IgT" im Verhältnis zu seinem B-Zell-Gegenstück beschreiben, die auf eine abweichende Konformation hindeutet.
Binz und Wigzell (64) finden keine leichten Ketten, sondern nur ein über -s-s-Brücken gekoppeltes Dimer, bestehend aus zwei 70 000 d Polypeptidketten, wobei über den Assoziationsgrad in der nativen Membran nichts ausgesagt werden kann. Zur Erhöhung der Wahrscheinlichkeit, antigene Determinanten auf einzelnen schweren Ketten zu erkennen, sollen Antiseren gegen isolierte, schwere Ketten von IgM p.c. (μ-Ketten) hergestellt werden.

3) Die von Eichmann et al. gefundene V_H-Genkontrolle der idiotypischen Determinanten auf Antikörpern und T-Zell-Rezeptoren läßt eine Reaktivität von Antiseren gegen Rahmen-Determinanten der variablen Domäne der schweren Ketten von IgM mit der Bindungsstelle und nahegelegenen Determinanten des T-Zellrezeptors erwarten. Die Präparation von Fd-Teilen der μ-Kette (Fdμ) sollte die Produktion von Antiseren ermöglichen, die solche Determinanten der variablen Domänen (V_H) erkennen.

4) Kreuzreaktionen von Antikörpern gegen Saccharide auf den präparierten μ-Ketten und Fdμ-Fragmenten mit Glycosid-Komponenten auf der Zelloberfläche von Lymphozyten soll durch oxidativen Abbau der Saccharidanteile der Antigene mit Perjodat eingeschränkt werden.

5) Säugetier-Antikörper reagieren stark mit T-Lymphozyten-Ig entwicklungsgeschichtlich alter Tiere (123) im Gegen-

satz zu T-Zell-Ig nahe verwandter Tierklassen. Die erweiterten Möglichkeiten der Antigenerkennung zwischen phylogenetisch weit voneinander entfernten Tierklassen soll durch bevorzugte Immunisierung von Hühnern, neben Kaninchen und Schaf , genutzt werden. Diese besondere Reaktivität der Vögel gegen Säuger-Immunglobulin könnte durch das Wegfallen der Hemmung der Immunantwort gegen hochkonservierte Selbst-Determinanten innerhalb der Säugetier-Klasse erklärt werden.

Mit den verschiedenen, so gewonnenen Antiseren sollte versucht werden, μ-Determinanten auf Maus-T-Lymphozyten in der Immunfluoreszenz und Zyto-Radioautographie nachzuweisen sowie die erkannten Moleküle aus der Membran von T-Lymphozyten zu isolieren und zu charakterisieren. Hinweise auf die Funktion der von den Antiseren erkannten Oberflächenstrukturen sollten Versuche zur Inhibition der Alloantigenerkennung durch T-Lymphozyten in der gemischten Lymphozytenkultur (MLC) erbringen. Mögliche Effekte auf Erkennungs- und Effektorphase stimulierter T-Lymphozyten gegen Alloantigentragende Zellen sollten Blockierungsversuche der zellvermittelten Zytotoxizität (CMC) zeigen.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien und Proteine

Die in den Untersuchungen verwendeten Materialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Buchler, Braunschweig
Na I-131 und Na I-125 (trägerfrei, 100 mCi/ml)
Natriumchromat 51 (5 mCi/ml)
Methyl-H3-Thymidin (18-25 Ci/mmol)

Becton, Dickinson & Co., Oxnard, Kalifornien/USA
100 µl Pipetten, 50 ml Falcon-Röhrchen, Siliclad

Behringwerke, Marburg
HSA, BSA

Bionetics, Kensington, USA
Aszites IgM104E, gereinigtes IgM104E, Maus IgG (Cohn II-Fraktion)

Biorad, Richmond, California
Dowex AG1-X2, 200-400 mesh, Agarose A 0.5, 200-400 mesh

Calbiochem, USA
Dithioerythrol (Clelands Reagenz), A grade

Difco Laboratories, Detroit, Michigan/USA:
Hanks-Medium, FKS, RPMi 1640-Medium, TC199 Medium

Eastman Kodak Co., Rochester, N.Y./USA
Tetramethyläthylendiamin

Fluka AG, Buchs SG/Schweiz
NP40, Triton X-100

Fenwal Inc., Ashland, Mass./USA
LP1 Leucopackfilter (Nylonwolle)

Gibco, Bio-Cult, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin-Lösung

LKB, Bromma/Schweden
Ultrogel AcA34

Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxidisulfat, Bromcyan, Chloramin T, Jodazetamid, Formalin, Acetonitril, Glycin, H_2O_2, Kaliumjodid, $Na_2S_2O_5$, Äthanolamin, Trichloressigsäure, Phenol

Miles GmbH, Frankfurt
Maus IgG, Hühner Ig, Kaninchen IgG, Maus IgM104E, Myelom K und λ-Ketten

Packard, Zürich
Soluene 350

Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala/Schweden
Blue Sephaorse CL-6B, Fikoll, Protein A, Sephadex-G25-Säulen, Sepharose 4B, 6B

Roth KG, Karlsruhe
Toluolszinitllator Rotiszint 11

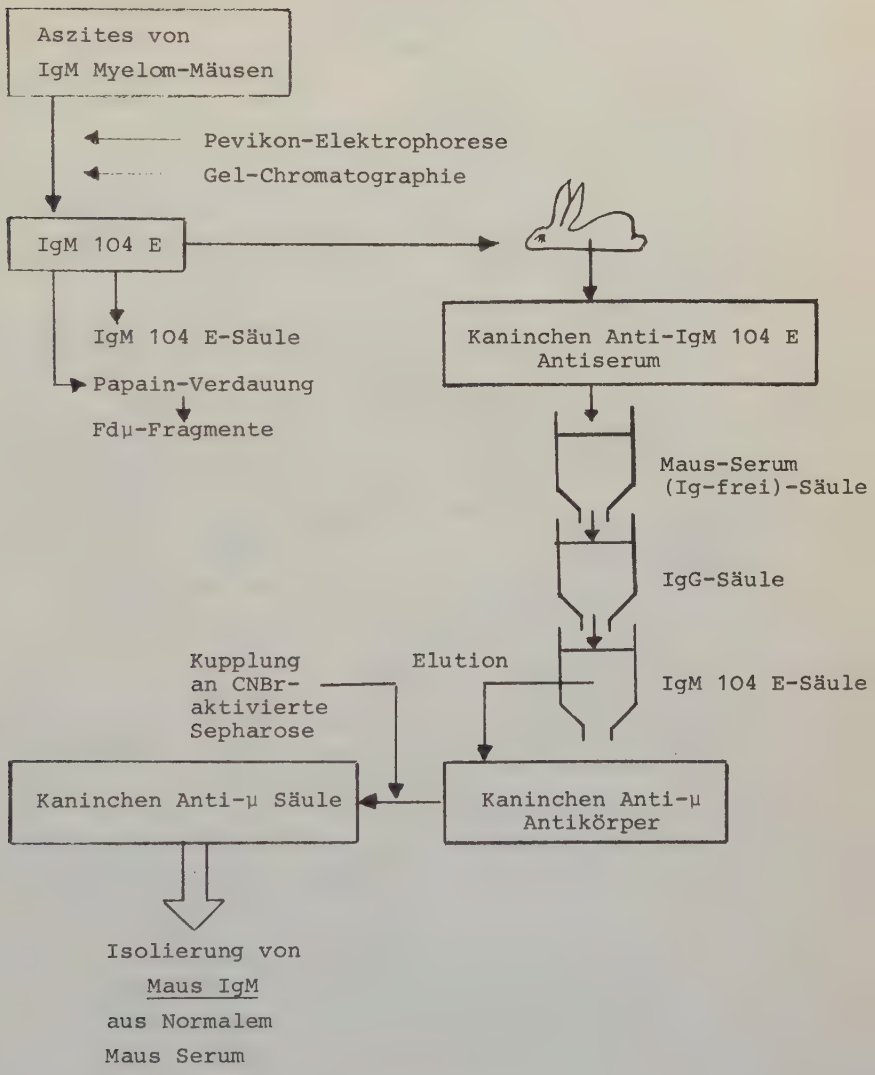
Sartorius Membranfilter GmbH, Göttingen
Membranfilter (SM 13400)

Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Acrylamid, Amberlite Na-CG50, Amidoschwarz 10B, Coomassie Brilliant Blue, Dialyseschläuche, N'N'Methylenbisacrylamid, Natriumdodecylsulfat, Pevicon C870, Papain, krist. reinst, Pepsin, reinst, Tetramethyläthylendiamin, Triton X-100

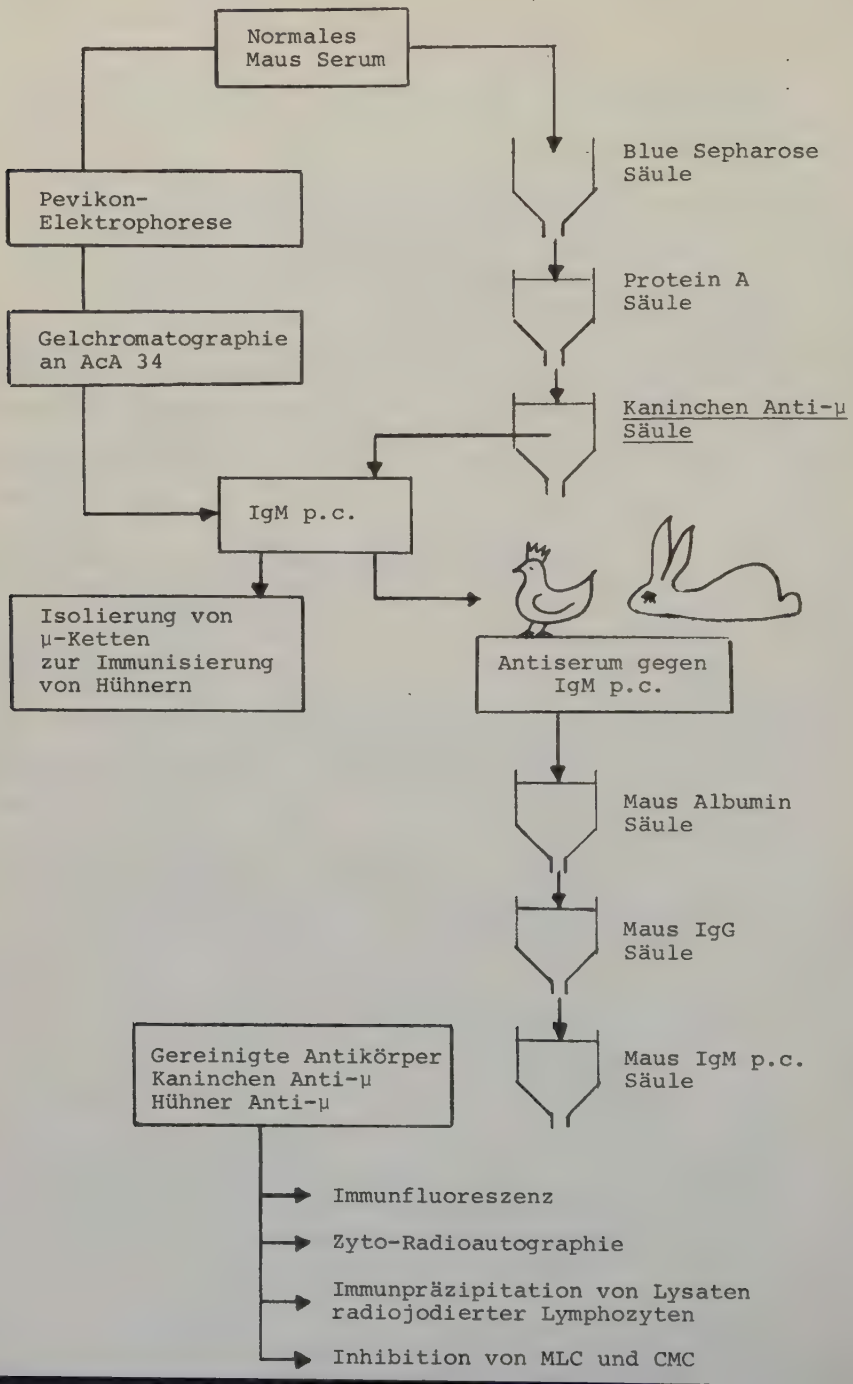
2. Geräte

Die neben der normalen Geräteausrüstung eines biochemisch und zellulär arbeitenden Labors benutzten Geräte wurden bei der Beschreibung ihrer Benutzung spezifiziert.

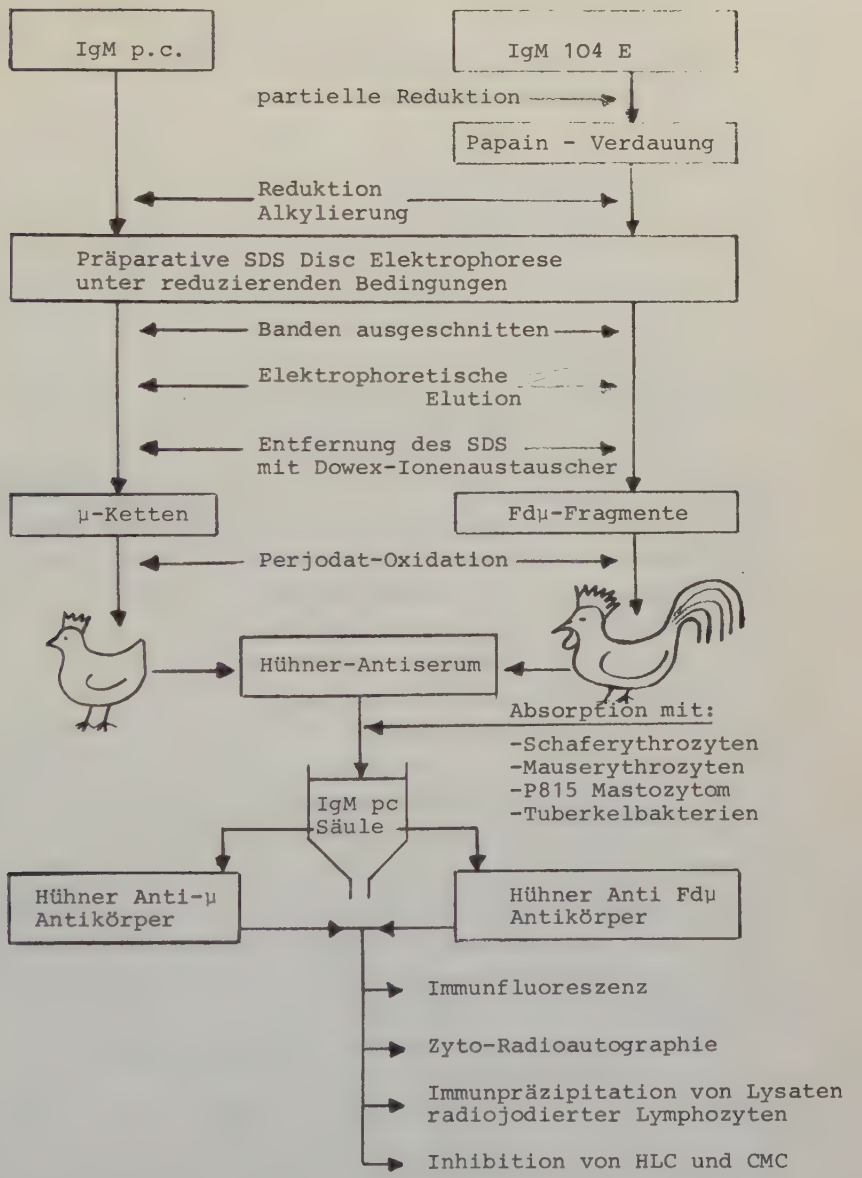
Schema der Herstellung einer Kaninchen Anti-Maus-μ-Ketten-Säule



Schema der Herstellung von Anti IgM p.c.-Antiseren und der Präparation μ-spezifischer Antikörper



Schema der Präparation von IgM-Fragmenten



3. Herstellung einer Kaninchen Anti Maus-μ-Ketten Säule

3.1. Isolierung von IgM aus dem Aszites von IgM 104E-Myelom-Mäusen

3.1.1. Pevikon Elektrophorese

1200 g Pevicon, ein Copolymer aus Polyvinylchlorid und Polyvinylacetat (Pevicon C870, Serva, Heidelberg), äquilibriert mit 0.05 M Barbitalpuffer pH 8.6, wurde in einen 48x18x1 cm großen Trog gegossen. In eine 13 cm vom schmalen Rand entfernte Rinne wurden 7 ml auf 50 mg Protein/ml eingeengter Aszites von IgM 104E-Myelom-Mäusen (Bionetics, Kensington, USA) mit Bromphenolblau aufgetragen. Nach 24 Std. (50 mA, 300-350 V) Laufzeit wurde der Block in 2 cm breite Fraktionen aufgeteilt, mit PBS Azid eluiert und nach Einengung die Proteinkonzentration (nach Lowry, siehe II, 3.1.3.) bestimmt sowie auf das Vorhandensein von IgM in der I.D. nach Ochterlony (II, 3.1.4.) und in der Immunelektrophorese (II, 3.1.5.) getestet.

3.1.2. Gelchromatographie mit Sepharose 6B

IgM-haltige Fraktionen, auf 2 ml eingeengt und gegen PBS Azid dialysiert, wurden auf eine kalibrierte, 2 x 100 cm große Sepharose 6B-Säule aufgetragen und bei $4^{o}C$ in PBS Azid aufgetrennt. Erhaltene Fraktionen wurden auf Protein-Konzentration und IgM-Gehalt getestet.

3.1.3. Proteinbestimmung nach Lowry (modifiziert) (70)

Chemikalien: - Lösung A: Na_2CO_3 20 g
NaOH 4 g
+ 1000 ml Aqua dest.

- Lösung B: $CuSO_4 \times 5\ H_2O$ 0.78 g
Na-K-Tartrat x 4 H_2O 1.34 g
+ 100 ml Aqua dest.

- Lösung C: 50 ml Lösung A + 1 ml Lösung B

- Lösung D: 1 ml Folin (Phenolreagenz, Merck)
+ 1.4 ml Aqua dest.

Durchführung des Tests:

Als Standard diente jeweils eine Menge von 30 µg Maus IgG. 10-50 µl einer Proteinlösung wurden mit 2 ml Reagenz C versetzt. Nach kurzem Schütteln inkubierte die Lösung 5 min bei Raumtemperatur. Danach wurden 0.2 ml Reagenz D hinzugegeben und kräftig umgeschüttelt. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 546 nm im Spektralphotometer (Model 24, Beckman, USA) gemessen. Die Proteinkonzentration wurde über die interne Eichgerade (gegeben durch Leerwert und 30 µg IgG-Extinktion) des Geräts ermittelt und konnte bis 50 µg eingesetztes Protein direkt abgelesen werden. Gemessen wurde gegen den Reagenzien-Leerwert im Einstrahl-Verfahren.

3.1.4. Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony (71)

Reagenzien: - Agarose (SeaKem, USA)
- NaN_3 (Merck, Darmstadt)
- 0.025 M Barbitalpuffer, pH 8.6

Eine 1.5 % Agarose-Suspension in 0.025 M Barbitalpuffer

pH 8.6 mit 0.02 % Azid versetzt wurde unter Rühren bis zum Kochen erhitzt. Je 5 ml dieser Lösung wurde mit einer erwärmten Glaspipette in eine genau waagrecht gestellte Plastikpetrischale (Ø 5 cm) pipettiert. Nach Abkühlen wurde der Deckel aufgesetzt und die Platten in einer feuchten Kammer bei 4°C aufbewahrt.
Zur Durchführung des Tests wurden je nach Problem verschieden große Löcher in verschiedenen Abständen ausgestanzt und mit AG und AK gefüllt.
Zur Optimierung der Präzipitation (Lage und Stärke der Präzipitationslinien) wurden verschiedene Verdünnungskombinationen von AG und AK in variablen Lochgrößen und Abständen benutzt. Auch mehrmalige Füllung von Stanzlöchern (ohne Unterbrechung der Diffusionskontinuität) wurde versucht.

3.1.5. Immunelektrophorese nach Schneidegger (72)

Eine 11 x 9 cm große Glasplatte wurde als Träger mit einem dünnen Film von 0.1 % Agarose überzogen. Nach dem Trocknen wurde die zweite Beschichtung auf einer absolut waagrechten Unterlage mit 20 ml einer 1.5 %igen Agarose-Lösung in Veronalpuffer (s.u.) durchgeführt. Nach 15 min Abkühlen an der Luft wurde die Platte dann bei 4°C in einer feuchten Kammer aufbewahrt.
Die Tröge für das Antiserum und die Löcher für die Proben wurden mit Hilfe einer Schablone ausgestanzt. Die Probe (10 µl) wurde mit Bromphenolblau angefärbt und in die Löcher pipettiert.
Die Elektrophorese wurde in einer Apparatur von LKB (Multiphor) durchgeführt. Als Elektrodenpuffer diente eine 1:4 Verdünnung einer Veronalpuffer-Stammlösung folgender Zusammensetzung: 19.62 g Na-Diäthylbarbiturat, 12.96 g Na-Acetat, 12 ml 1 N HCl ad 2 l, pH 8.6.
Bei einer Stromstärke von 50 mA dauerte die Elektrophorese ca. 1 Stunde. Nach der Elektrophorese wurden die vorgestanzten Tröge ausgehoben und mit Antiserum gefüllt (Volumen ca.

100 µl). Zum Präzipitieren legte man die Platten in eine feuchte Kammer und entwickelte bei 4°C mindestens 24 Stunden. Nichtpräzipitierte Proteine wurden durch zweitägige Elution mit PBS und anschließendes Spülen mit Wasser entfernt.
Zur Dokumentation wurden die Präzipitate mit 0.5 % Amidoschwarz 10B (von Serva) in Äthanol/Eisessig (9+1) für 10 min bei Zimmertemperatur gefärbt und in Äthanol/Eisessig (9+1) entfärbt. Das Trocknen der Agarosegele geschah analog zu Polyacrylamidgelen mit dem Trocknungsgerät von Hoefer (siehe 3.1.6.).

3.1.6. Analytische SDS-Diskelektrophorese

Zur Analyse der Reinheit des isolierten IgM und später beschriebener Präparationen sowie zur Molekulargewichtsbestimmung wurde die SDS-Disk-Elektrophorese herangezogen, weil sie eine hohe Auflösung entsprechend dem Molekulargewicht bei nur geringem Verbrauch an Probenmaterial liefert.

Herstellung des Gels

Bei der verwendeten Apparatur handelte es sich um ein Werkstattmodell, welches im Prinzip den üblichen Geräten zur Plattengelelektrophorese ähnelt. Die Kammer hatte die Abmessungen von 1.5 x 160 x 180 mm. Die Abdichtung der kapillaren Spalten zwischen den Seitenstegen und den Glasplatten erfolgte mit 2 %iger heißer Agarose-Lösung. Als Puffersystem wurde das von Laemmli angegebene (73) verwendet.
In Bezug auf die Gelkonzentration wurde mit 5 % und 10 % Gelen sowie mit verschiedenen exponentiellen und linearen Gradientengelen (meist 5-15 %) gearbeitet. Die Zusammensetzung des 10 % Trenngels ist aus Tab. 1 ersichtlich. Nach der Zugabe von Glycerin wurde gründlich entgast, da O_2 als Biradikal die radikalische Polymerisation inhibiert und um Bläschenbildung im Gel zu verhindern. Der exponentielle Gradient

Tabelle 1: Zusammensetzung des 10-prozentigen Trenngels für die SDS-Diskelektrophorese

Reagenz	Volumen ml	Endkonzentration im Gel
1 M Tris-HCl, pH 8.8	18.75	0.375 M
Aqua bidest.	12.85	
30 % Acrylamid + 0.8 % Bisacrylamid	16.65	10 %
	ENTLÜFTEN!	
10 % SDS	0.5	0.1 %
5 % TEMED	0.25	0.025 %
3 % Na-Peroxidisulfat	1.0	0.07 %

Tabelle 2: Zusammensetzung des 3-prozentigen Sammelgels

Reagenz	Volumen ml	Endkonzentration im Gel
1 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25	0.125 M
Aqua bidest.	7.4	
30 % Acrylamid + 0.8 % Bisacrylamid	1.0	3 %
	ENTLÜFTEN!	
10 % SDS	0.1	0.1 %
5 % TEMED	0.1	0.05 %
3 % Na-Peroxidisulfat	0.2	0.07 %

Tabelle 3: Zusammensetzung von 5 %, 7.5 %, 12.5 % und 15 % Trenngelen

	5 % ml	7.5 % ml	12.5 % ml	15 % ml
Tris pH 8.8	15.0	15.0	15.0	15.0
Aqua bidest	17.2	14.5	7.5	4.5
30 % Acrylamid + 0.8 % Bisacrylamid	6.7	10.0	16.7	20.0
		ENTLÜFTEN!		
10 % SDS	0.4	0.4	0.4	0.4
5 % TEMED	0.2	0.2	0.2	0.2
3 % Na-Peroxidisulfat	1.2	0.6	0.4	0.4

Bei Gradientengelen wurde der höherprozentigen Acrylamid-Lösung 2 ml Glycerin (statt Aqua bidest.) zugesetzt.

wurde mit Hilfe einer dreikanaligen Schlauchpumpe durch Mischung einer 5 %igen und einer 15 %igen Acrylamidlösung (Tab. 3) gegossen. Die Polymerisation dieses Trenngels dauerte etwa 45 min. Danach wurde die über dem Gel gebildete Flüssigkeit entfernt und das 3 %ige Sammelgel (Tab. 2) aufgegossen, dessen Polymerisationsdauer bei 2 Std. lag. Durch Einsetzen eines Kammes mit 10 - 23 Zähnen wurden im Sammelgel Taschen ausgespart, in welche die Proben aufgetragen wurden.

Vorbehandlung der Proben und Elektrophorese

Die Proben (Immunglobuline, Immunpräzipitate) wurden in einem Puffer (Final Sample Buffer) mit folgender Zusammensetzung solubilisiert: 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8; 3 % SDS; 5 - 10 % 2-Mercaptoäthanol; 10 % Glycerin und 0.01 % Bromphenolblau. Zur Reduktion sämtlicher Proteine und Inaktivierung der Proteasen wurde diese Mischung 5 min im Wasserbad ge-

kocht. Danach konnten die Proben mehrere Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden.
Die 12 Taschen des Sammelgels, mit einem Volumen von ca. 100 µl, wurden mit folgendem Puffer gefüllt: 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8; 1 % Glycerin; 1 % SDS. Dieser Puffer wurde mit Hilfe einer 100 µl Pipette (Becton, Dickinson & Co.) mit den Proben unterschichtet, nachdem das Gel am Elektrophoresegerät befestigt war.
Anschließend wurden die Pufferreservoire mit dem Laufpuffer (0.025 M Tris, 0.192 M Glycin, 0.1 % SDS) gefüllt und die Elektrophorese mit 80 V bei etwa 35 mA gestartet. Nach dem Eindringen der Proben in das Trenngel wurde die Spannung auf 100-120 V erhöht und während des gesamten Laufs konstant gehalten. Bei dieser Spannung dauerte die Elektrophorese bei Raumtemperatur 8 - 12 Std.

Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue

Die Proteinbanden im Gel wurden nach der Methode von Dulaney und Touster (74) fixiert und sichtbar gemacht: Das Gel wurde für 1 Std. bei 37°C in eine Lösung von 0.5 % Coomassie Brilliant Blue (R250, von Serva), 45 % Aqua dest. und 10 % Eisessig gelegt und dabei gut geschüttelt. Entfärbt wurde es in einer Lösung von 10 % Äthanol, 83 % Aqua dest und 7 % Eisessig über mehrere Stunden.

Trocknen des Gels

Unter Vakuumdruck wurden die Gele in einem "Slab Gel Dryer" der Firma Hoefer Scientific Instruments, San Francisco/USA, getrocknet (80°C) und auf Filterpapier oder Cellophanfolien aufgezogen. Hierbei wurden oft Gele durch Schwankungen in Temperatur und/oder im angelegten Unterdruck beschädigt. Ein Zusatz von 10 % Glycerin zur letzten Entfärbelösung verringerte die Zerreißneigung.

3.1.7. Molekulargewichtsbestimmung

Die SDS-Diskelektrophorese eignet sich nach Weber und Osborn (76) zur Molekulargewichtsbestimmung. Wenn man den Logarithmus des Molekulargewichts gegen die Wanderungsstrecke aufträgt, so erhält man zwischen 10^4 und 10^5 daltons in erster Näherung eine Gerade.
Als Eichproteine in Gelläufen unter reduzierenden Bedingungen dienten Cytochrom C aus Pferdeherz (12 400 daltons), L-Kette (23 000) und H-Kette (50 000) vom Maus-IgG Ovalbumin (43 000), Rinderserumalbumin (67 000) und die H-Kette von Maus-IgM 104E (73 000). Für Gele unter nichtreduzierenden Bedingungen wurde neben Ovalbumin und BSA auch Maus-IgG (150 000 d) auch dessen $F(ab')_2$-Fragment (100 000 d) sowie Phosphorylase A (98 000 d) verwendet.
Allerdings sind die auf diese Weise errechneten Molekulargewichte nur scheinbare Molekulargewichte, weil andere Kriterien (wie z.B. Zuckerkomponenten, SDS-Bindungskapazität) die Wanderungsgeschwindigkeit eines Proteins unabhängig von seiner Größe mitbestimmen. Deshalb wurde zur MG-Bestimmung von Ig und Ig-Fragmenten bevorzugte Ig-Eich-Proteine benutzt, die einen vergleichbaren Zuckergehalt besitzen.

3.2. Immunisierung von Kaninchen mit IgM 104E

Vier Laborkaninchen erhielten Injektionen von je 200 bis 500 µg gereinigtes IgM 104E in 1 ml CFA-Suspension intramuskulär (i.m.) und subcutan (s.c.) im Abstand von 4 Wochen.

In den folgenden (bis zu vier) Booster-Injektionen wurde das IgM in physiologischer Kochsalzlösung i.m. verabreicht. Blutentnahme von bis zu 80 ml erfolgte alle 2 Wochen (Methodik siehe II, 5.1.).

3.3. Präparation von gereinigten, Anti-μ-Kette spezifischen Antikörpern

Kaninchen-Anti-IgM Antiserum (5 ml) wurde über folgende drei miteinander gekoppelte Affinitäts-Säulen absorbiert:

a) Maus-Immunglobulin-"Loch"-Säule
b) Maus-IgG-Säule
c) Maus-IgM 104E-Säule

zu a) Sämtliche Fraktionen von NMS (258 mg Protein) , die nach Auftrennung in der Pevicon-Elektrophorese kein Ig enthielten, wurden mit Hilfe der CN-Br-Methode (siehe II, 3.4.) an Sepharose 4B (50 ml) gekuppelt (von Dr. Linke zur Verfügung gestellt).

zu b) 15 mg Maus-IgG Cohn II-Fraktion (Miles) wurden an 10 ml Sepharose gekuppelt (siehe II, 3.4.).

zu c) 15 mg gereinigtes Maus-IgM 104E wurden an 10 ml Sepharose gekuppelt (siehe II, 3.4.)

Die mit Säule a) und b) von Aktivitäten gegen Nicht-Ig-Maus-Serumproteine und Maus IgG (γ-Ketten und L-Ketten) gereinigten Kaninchen αIgM-AK banden auf der IgM-Säule. Sie wurden nach Spülen mit 15 Säulenvolumen Puffer mit 5 M $MgCl_2$, pH 7.4, eluiert, dialysiert und eingeengt. Alle Schritte der Präparation fanden bei 4°C in 0.15 M Tris/NaCl Puffer, pH 7.4, statt. Aktivität und αμ-Spezifität wurden mittels I.D. getestet. Die Kapazität der Säulen wurde durch I.D.-Test des Effluens gegen das gekuppelte Antigen bei verschiedenen Auftragsmengen bestimmt.

3.4. Kupplung an Sepharose

90 mg des Anti-μ-spezifischen Kaninchen-AK wurden an 5 ml aktivierte Sepharose 4B gebunden. Diese kovalente Bindung von Antikörpern (oder Antigenen) an einen unlöslichen Träger, wie z.B. Sepharose 4B, wurde in einer Modifikation (98)

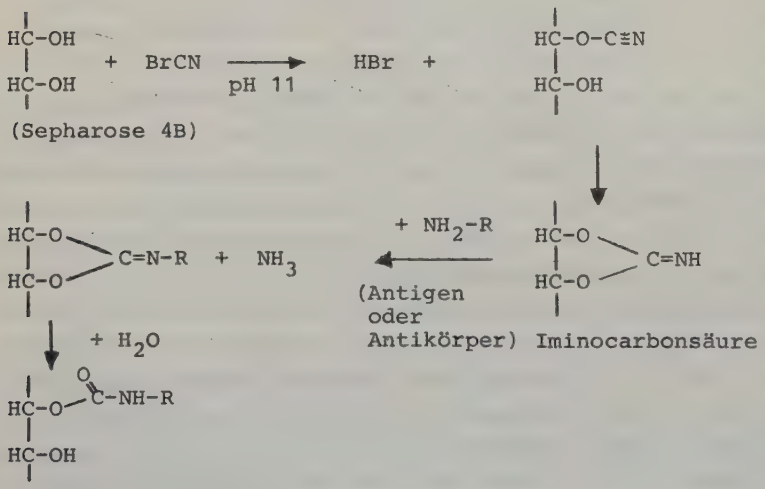
der Methode von March et al. (77) und Porath (78) durchgeführt.

Sepharose 4B (Deutsche Pharmacia, Freiburg) wurde mit dem 20-fachen Volumen eiskaltem, destilliertem Wasser auf einer Nutsche gewaschen. Das trockengesaugte Gel wurde in ein Becherglas gefüllt und mit dem gleichen Volumen 5 M K-Phosphatpuffer, pH 11,0 (mit Raumtemperatur) versetzt. Der Puffer hatte folgende Zusammensetzung: 1.67 M K_2HPO_4 und 3.33 M K_3PO_4 (Methode von Porath, s.o.).

Zur Aktivierung der Sepharose wurde eine Lösung von CNBr (Fluka, Buchs, Schweiz) in Acetonitril (Merck p.a., Darmstadt) eingesetzt. Dabei wurde auf 2 g CNBr 1 ml Acetonitril verwendet. Zu 10 Volumina der mit einem Rührstab schonend gerührten Sepharosesuspension wurde dann bei Raumtemperatur 1 Volumen der Acetonitril-Lösung zugegeben. Nach genau 2 min wurde der gesamte Inhalt des Becherglases auf eine Nutsche gegeben und abgesaugt. Hernach wurde mit dem 5-fachen Volumen eiskaltem 0.1 M $NaHCO_3$-Puffer gewaschen, jedoch ein Trockensaugen des Gels vermieden. Anschließend erfolgte eine Waschung mit dem 10-fachen Volumen eiskaltem, destilliertem Wasser, und zum Schluß wurde das Gel zur Trokkene abgesaugt. Ein Volumen der so aktivierten Sepharose wurde unverzüglich mit einem Puvertrichter zu einem Volumen der bereitgestellten Proteinlösung gegeben und sofort kräftig geschüttelt. Die zur Kupplung bestimmten Proteine waren zuvor gegen 0.5 M $NaHCO_3$ (für Antigene; eingesetzte Konzentration = 3 mg/ml) bzw. gegen 0.5 M Citratpuffer, pH 6.5 (für Antikörper; eingesetzte Konz. = 10 mg/ml) dialysiert und anschließend in dicht schließende Gefäße überführt und bei 4°C bereitgestellt worden. Auf einem Schüttler (New Brunswick, New Jersey, USA) wurde die Suspension dann 24 Std. bei 4°C geschüttelt. Etwa verbleibende reaktive Gruppen wurden durch Zugabe von 0.5 M Äthanolamin, pH 8.4 (Verhältnis 1:100), für 3 Std. blockiert. Die Immunadsorbentien wurden anschließend nacheinander mit folgenden entgasten Lösungen in der Nutsche gewaschen:

gekuppelte Antigene: - PBS (10 Vol),
- 3 M NaCl (10 Vol),
- PBS (10 Vol) und
- 6 M Guanidin (2 Vol, langsma durchsickern lassen)
- PBS (10 Vol)

Gekuppelte Antikörper wurden statt mit 6 M Guanidin mit weniger denaturierendem 4 M Harnstoff in 0.1 M Acetatpuffer pH 4.5 gewaschen.
Zur Bestimmung der Kupplungseffizienz wurde die gesamte Waschflüssigkeit eingeengt, dialysiert und der Proteingehalt bestimmt (Lowry). Die Aufbewahrung erfolgte als Suspension in PBS-Azid bei 4°C.
Ein mögliches Reaktionsschema:



4. Isolierung von Normalem Maus IgM (polyclonales IgM) aus Normalem Maus Serum (NMS)

4.1. Reinigung mittels Affinitätschromatographie

4.1.1. Gewinnung von Mausserum (NMS)

Das durch Herzpunktion aus (C57bl x DBA) F1-Mäusen in Äthernarkose gewonnene Blut (1 - 1.5 ml pro Maus) wurde in einem Glasröhrchen vereinigt und koagulierte zunächst 2 Std. bei Raumtemperatur. Zur vollständigen Retraktion des Blutkuchens wurde das Blut über Nacht bei 4°C aufbewahrt und dann 2 mal für 10 min bei 400-500 x g abzentrifugiert. Zur Entfernung etwa verbliebener Erythrozyten und Zellfragmente zentrifugierte man die Überstände für 20 min bei 20000 x g und 4°C. Anschließend wurden die Seren bei -20°C eingefroren.

4.1.2. Entfernung von Albumin aus Mausserum mit Hilfe von "Blue Sepharose"

Zur Reduzierung unspezifischer Bindung von Albumin an die Kαμ-Säule wurde ein Großteil des Serum-Albumins mittels "Blue Sepharose CL-6B" (Pharmacia, Uppsala) entfernt. Blue Sepharose besteht aus Sepharose CL-6B mit kovalent über Triazin gebundenem Farbstoff Cibacron Blue F3G-A.
Nach Travis et al. (79) besitzt es eine Bindungskapazität von 5 mg Human-Albumin pro ml gequollenes Gel.
Die Elution des gebundenen Albumins erfolgte mit 6 M Guanidin in PBS.

4.1.3. Entfernung von IgG aus Mausserum mit Hilfe von Protein A

Um IgG-Kontaminationen des zu präparierenden IgM geringer zu halten, wurde das NMS zusätzlich über eine Sepharose 4B-Säule mit kovalent gekuppeltem Protein A (Pharmacia, Uppsala) absorbiert.
Protein A ist ein Oberflächenprotein des Bakteriums Staphylococcus aureus, das die Eigenschaft hat, die Fc-Teile von IgG der meisten Säugetierspezies zu binden (80,92). Die Elution des gebundenen IgG erfolgte mit 6 M Guanidin in PBS-Azid.

4.1.4. Isolierung von polyclonalem IgM (IgM p.c.) auf der Kaninchen Anti-μ-Säule

Je 3 ml von Albumin und IgG depletiertem NMS wurden auf die Kαμ-Söule langsam aufgetragen. Nach Waschen mit 15 Säulenvolumina PBS-Azid wurden vorwiegend unspezifisch adsorbierte Proteine mit 2 M NaCl in 0.1 M Glycinpuffer, pH 9.5, eluiert. Je ein Säulenvolumen 0.5 M Essigsäure und 0.5 M Ammoniumhydroxyd, jeweils gefolgt von 1 Säulenvolumen PBS-Azid, eluierten das spezifisch gebundene IgM. Nach Säuberung der Säule mit 1 Säulenvolumen 4 M Harnstoff in 0.1 M Natriumazetatpuffer, pH 4.5, und Spülen von 10 Volumen PBS-Az erfolgte der nächste Auftrag von NMS.

4.1.5. Weiterreinigung von affinitätschromatographisch präpariertem IgM p.c. mittels Säulenchromatographie an "Sepharose G150 superfine"

7 mg IgM aus Präparationen mit der Kαμ-Säule wurden auf einer kalibrierten Sephadex G150 superfine-Säule in dissoziierendem Tris-Glycinpuffer pH 7.6 (Tris 0.2 M, Glycin 0.5 M) aufgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-Disc-PAGE analysiert.

4.1.6. Densitometrische Analyse von SDS-Disc-PAGE-Gelen

Zur Quantifizierung der erhaltenen μ- und L-Kettenbanden im Verhältnis zu den beobachteten Verunreinigungen wurden die auf Zellophan-Folie aufgezogenen Gele desitometrisch analysiert. Dazu diente ein Beckman Microzone Densitometer, Modell R110 (Spalt 0.2 mm, Filter 1.4 cal). In der Eichkurve wurden die Integrator-Einheiten des Scanners mit verschiedenen, auf das Gel aufgetragenen IgM-Mengen korreliert. Die spezifische Anfärbung der aufgetrennten Proteine durch Coomassie Brilliant Blue wurde als vergleichbar angenommen.

4.2. Reinigung von Normalem Maus IgM mit "klassischen" Methoden

4.2.1. AcA34-Chromatographie

100 ml F_1NS wurden in neun Läufen auf einer AcA34-Säule (Ultrogel AcA34, von LKB, Bromma, Schweden, 5 cm x 100 cm-Säule) in dissoziierendem Tris-Glycinpuffer pH 7.6 (0.2 M Tris, 0.5 M Glycin) bei 4°C aufgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden auf IgG- und IgM-Gehalt getestet (I.D., SDS-Disc-PAGE).

4.2.2. Pevicon-Elektrophorese

IgM-haltige Fraktionen (22 mg) der neun AcA34-Läufe wurden in zwei Peviconblocks elektrophoretisch aufgetrennt (Methodik siehe II, 3.1.1.), in 24 Fraktionen aufgeteilt und in der SDS-Disc-PAGE sowie im Ouchterlony analysiert.
Das so in zwei Schritten hochangereicherte polyklonale Maus-IgM wurde zu einem Teil affinitätschromatographisch weitergereinigt (siehe II, 4.1.4.), ein anderer Teil diente zur Präparation isolierter µ-Ketten (siehe II, 10.1.). Die höchstgereinigten Fraktionen wurden zur Immunisierung und zur Herstellung von IgM p.c.-Säulen (siehe II, 6.2.1.) verwendet.

5. Gewinnung von Antiseren gegen IgM p.c.

5.1. Kaninchen

Fünf erwachsene Kaninchen erhielten nach Abnahme von Präimmunserum 250-750 µg IgM als Wasser/Öl-Emulsion (1-2 ml) mit der gleichen Menge an "Komplettem Freunds Adjuvans" (CFA) subcutan und intramuskulär injiziert. Nach 3-6 Boosterinjektionen der gleichen Menge IgM in CFA in 4-wöchigem Abstand folgten bis zu 8 Booster in "Inkomplettem Freunds Adjuvans" (ohne Tuberkelbazillen) subcutan. Blutungen (bis 80 ml) aus der Ohrarterie erfolgten jeweils 14 Tage nach der Injektion. Dazu wurde die Hauptarterie des rasierten und desinfizierten Hasenohrs mit einem Skalpell eröffnet und das ausströmende Blut in einem Zentrifugenbecher aus Glas aufgefangen. Leichtes Klopfen auf den Ohransatz verringerte die reflektorische Kontraktion der Arterie. Nach kompletter Kontraktion des Blutkuchens ca. 3 Std. bei Zimmertemperatur und bei 4°C über Nacht wurde dieser entfernt und das Serum 20' bei 300 g und 20' bei 20000 g und 4°C zentrifugiert, aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

5.2. Schaf

Ein erwachsenes Schaf, das 6 Boosterinjektionen von je 3 - 5 mg Maus Immunglobulinen in CFA erhalten hatte, wurde noch zweimal mit je 2 mg IgM in CFA subcutan und intramuskulär in 4-wöchigem Abstand injiziert und dann ausgeblutet (1,6 l Serum).

5.3. Hühner

10 Hühner wurden nach Abnahme von Präimmunserum je dreimal in 4-wöchigem Abstand mit 100 bis 400 µg IgM in 1 ml CFA-Emulsion an 4 Stellen in die Brustmuskulatur injiziert. Die Blutentnahme erfolgte aus Flügelvenen oder durch Herzpunktion jeweils 14 Tage nach Immunisierung zur Titerbestimmung. Zur finalen Blutentnahme (nach drei Boosterinjektionen) wurde nach Injektion von 75 mg Evipan^{R} (Bayer) und 1000 Einheiten Heparin (Liquemin^{R}, Roche, Grenzach) in die Flügelvene die Carotis freipräpariert und mit einer Butterfly-Kanüle (21-G) kanuliert. Das in einem Glasgefäß gesammelte Blut (70 bis 110 ml) wurde durch zweimalige Zentrifugation (15 min mit 300 g) von den zellulären Blutbestandteilen befreit. Das Plasma wurde vor dem Einfrieren bei -20^{o}C noch einmal 20' bei 40000 g abzentrifugiert. Das mußte nach dem Auftauen wiederholt werden, um die immer wieder auftretenden Fibrin-Gerinnsel zu entfernen.

6. Isolierung von gereinigten Antikörper-Fraktionen aus Anti-IgM-Antiserum

6.1. Präparation von Immunglobulin-angereicherten Fraktionen durch Fällung mit Neutralsalzen

6.1.1. Ammoniumsulfat-Fällung bei Kaninchenantiseren

15 ml KαIgM-AS wurden nach (81) bei 0°C unter Rühren tropfenweise (durch 20 ml-Spritze und Kanüle tropfen lassen) mit dem gleichen Volumen 80 % gesättigter Ammoniumsulfatlösung (146 g/l Lösung) versetzt. Nach Inkubation über Nacht wurden die Präzipitate 45' bei 8000 g abzentrifugiert und zweimal mit 40 % gesättigter $(NH_4)_2SO_4$-Lösung gewaschen, in 5 ml PBS gelöst und gegen drei Mal 2 l PBS 16 Std. lang dialysiert.
Nach Einengung auf 6 ml wurden 4 ml der mit 40 % $(NH_4)_2SO_4$-präzipitierten Lösung noch einmal mit 35 % gesättigter $(NH_4)_2SO_4$-Lösung präzipitiert (Methode wie oben).
Die Anreicherung wurde mit Hilfe von SDS-Disc-PAGE und IE getestet.

6.1.2. Natriumsulfat-Fällung bei Hühnerantiseren

2 ml Hühner-AS wurden nach (82) tropfenweise unter Rühren mit 2 ml 36 % (w/v) Na_2SO_4-Lösung versetzt. Nach Präzipitation bei Zimmertemperatur für 4 Std. wurde abzentrifugiert (30', 8000 g) und zweimal mit 5 ml 18 %iger (w/v) Na_2SO_4-Lösung gewaschen. Die nur teilweise in 2 ml Wasser wieder löslichen Präzipitate wurden nach obiger Methode ein zweites Mal mit 14 % (w/v) Na_2SO_4-Lösung präzipitiert, in 1 ml Wasser aufgenommen und 2 Tage gegen PBS dialysiert. Die von den unlöslichen Präzipitaten abzentrifugierte (10', 8000 g) Lösung in PBS zeigte permanent Präzipitatbildung

bei 4°C, sehr stark beim Einfrieren (-20°C) und Auftauen. Die Lagerung bei pH 5.5, 4°C, reduzierte die Aggregationstendenz weitgehend.
Die Ig-Anreicherung wurde in der SDS-Disc-PAGE nachgewiesen.

6.2. Präparation gereinigter Anti-µ-Ketten spezifischer Antikörper mittels Affinitätschromatographie

6.2.1. Kaninchen-Antikörper

Zur Erzeugung der Anti-µ-Spezifität ist die Absorption der Anti-Leichte-Ketten-Aktivität des Anti-IgM-AS nötig. Zu diesem Zweck wurden der IgM p.c.-Säule eine MIgG-Säule vorgeschaltet. Zur Absorption eventueller Anti-Albumin-Aktivitäten wurde noch zusätzlich eine Albumin-Säule benutzt. Alle Präparationsschritte fanden in PBS-Azid statt.
Nach Austesten der Säulenkapazitäten wurden je 3 ml Kaninchen Anti-IgM-AS auf folgende drei in dieser Reihenfolge gekoppelten Säulen aufgetragen:

a) Maus Albumin-Säule
b) Normales Maus IgG-Säule
c) Normales Maus IgM-Säule

Die auf der M-IgM-Säule bindenden AK wurden mit 0.5 M Essigsäure und 0.5 M Ammoniumhydroxyd eluiert, neutralisiert, dialysiert (PBS-Azid), eingeengt und auf Aktivität und Spezifität in der I.D. getestet.

zu a) Maus Albumin-Säule
16 mg Albumin-Fraktion einer Pevicon-Elektrophorese von NMS wurden an 16 ml CNBr aktivierte Sepharose 4B gekuppelt.

zu b) Maus IgG-Säule
2-4 ml NMS aus C57bl/6-Mäusen wurde auf eine KαM-IgG-Säule aufgetragen (70 mg AK, mit 0.5 M Essigsäure von insolubilisiertem Maus-IgG (Cohn II-Fraktion,

Miles) an 10 ml Sepharose gekuppelt). Nach Elution mit 0.5 M Essigsäure und 0.5 M Ammoniumhydroxid wurde neutralisiert, dialysiert, eingeengt und auf Reinheit in I.D. und SDS-Disc-PAGE untersucht.

zu c) Normales Maus IgM-Säule
7 mg polyclonales Maus-IgM (Reinigung siehe II, 4.2.) wurden an 10 ml CNBr aktivierte Sepharose gekuppelt.

6.2.2. Hühner-Antikörper

Zur Isolierung von Hühner αμ-AK fand die gleiche Methodik wie zur Präparation der Kaninchen αμ-AK Verwendung. Die so gereinigten Hühner- und Kaninchen-AK sowie die Ausgangsseren wurden in folgenden Tests auf ihre Aktivität untersucht:

- IF auf verschiedenen Maus-Lymphozyten-Populationen (siehe II, 15.)
- Autoradiographie auf verschiedenen Maus-Lymphozyten-Populationen (siehe II, 16.)
- Inhibition der CMC (siehe II, 20.)
- Inhibition der MLC (siehe II, 18.)

7. Gewinnung von Kontrollseren

Als Kontrollseren wurden neben gepoolten Normalseren (NMS, NHS) und den individuellen Präimmunseren auch Immunseren gegen nicht-verwandte Antigene verwendet (α-KLH, α-BSA).

7.1. Kaninchen-Antiseren

Je zwei Kaninchen wurden nach dem in II, 5.1. angegebenen Schema immunisiert mit:

a) Keyhole limped hemocyanin (KLH, A grade, von Calbiochem, San Diego) (400 µg pro Injektion in 1 ml CFA-Emulsion)

b) Normales Maus-IgG (Cohn II-Fraktion, von Miles) (je 400 µg in 1 ml CFA-Emulsion)

7.2. Hühner-Antiseren

Je 3 Hühner wurden wie in II, 5.2. beschrieben mit folgenden Antigenen injiziert:

a) KLH (je 400 µg in 1 ml CFA-Emulsion)

b) Normales Maus-IgG (je 400 µg in 1 ml CFA-Emulsion)

c) $F(ab')_2$-Fragment von Normalem Maus-IgG, Cohn II-Fraktion (Herstellung analog zu II, 15.2.2.) (je 400-1000 µg in 1 ml CFA-Emulsion

d) κ-Kette aus Maus-Myelom RPC 21 (Bionetics, je 400 µg in 1 ml CFA-Emulsion)

8. Gewinnung von gereinigten Antikörpern als Kontroll-Antikörper

Als relevante Kontrollen neben normalem Ig der jeweiligen Spezies wurde auch spezifisches Hühner Anti-KLH als gereinigter AK mittels Affinitätschromatographie an einer KLH-Sepharose 4B Säule (75 mg KLH an 30 ml Sepharose nach II, 3.4.) isoliert. Nach Auftrag von 10 ml Hühner α-KLH-Serum und Spülen wurden die AK mit 0.5 M Essigsäure und 0.5 M Ammoniumhydroxyd eluiert, dialysiert, eingeengt und im Ouchterlony auf Aktivität getestet.

9. Absorption von Antiseren und von gereinigten Antikörpern mit vitalen Zellen

9.1. Zellen

9.1.1. Schaf-Erythrozyten

Hammelblut mit Stabilisator (Behringwerke, Marburg) wurde abzentrifugiert (2 x 15', 400 g) und das Sediment in PBS aufgenommen. Zur Trennung der peripheren Lymphozyten von den Erythrozyten wurde über einen Ficoll-Stufengradienten mit der Dichte 1.08 g/ml zentrifugiert (9.239 g Ficoll (Pharmacia) ad 119.4 ml Aqua dest.). Diese Trennung ist nötig, da membrangebundenes IgM der Lymphozyten die αμ-Aktivität der AS absorbieren könnte.
Auf 40 ml der Ficoll-Lösung wurden bei Raumtemperatur 40 ml 1:1 mit PBS verdünntes, gewaschenes Hammelblut überschichtet. Nach Zentrifugation 40 min bei 400 g bei 20°C bildet sich ein Sediment von Erythrozyten und auch Granulozyten. Die Lymphozyten sammeln sich an der Grenzschicht.
Nach Dekantieren des Überstands wurde das Erythrozyten-Sediment 3 x mit PBS bei 4°C gewaschen.

9.1.2. Maus-Erythrozyten

Ingezüchtete Mäuse (DBA x C57bl) F_1 in Äther-Narkose wurden durch Herzpunktion entblutet. Die Gerinnung wurde durch Vorlage von 300 U Heparin (Liquemin^R, Roche) pro Maus verhindert. Das Blut von jeweils 10 Mäusen (ca. 12 ml) wurde auf 40 ml mit PBS verdünnt und auf eine 40 ml Ficoll-Lösung der Dichte 1.075 g/ml überschichtet. Nach Zentrifugation (50 min/400 g bei 30°C) wurde wie in II, 9.1.1. aufgearbeitet.

9.1.3. P815-Mastozytomzellen der Maus

Das Methylcholanthren induzierte Mastozytom P815-X2 (83) mit Histokompatibilitätsantigenen H-2^d besitzt kein Oberflächen-Ig. Es wurde von Prof. H. Wagner, Mainz, zur Verfügung gestellt.

In vivo propagierte P815-Zellen

Das P815-Mastozytom wächst als Einzelzellsuspension im Aszites weiblicher DBA/2 Mäuse mit den Histokompatibilitätsantigenen H-2^d.
Der Tumor wurde durch die intraperitoneale Injektion von 0.3 ml Aszitesflüssigkeit von tumortragenden Mäusen propagiert. Nach 6-8 Tagen wurden durch Abziehen des Aszites die Zellen entnommen, zu einem Teil in neue Mäuse transferiert und zum anderen für die Absorption von Antiseren, als Stimulatorzellen in der MLC und als Zielzellen in der CMC eingesetzt. Für Absorptionen wurden 2-3 x 10^9 Zellen in 50 ml-Röhrchen (Falcon Nr. 2070) 7 min bei 150 x g abzentrifugiert, in 40 ml kalter PBS-Lösung resuspendiert und wieder 7 min bei 200 x g zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt, dann wurde die Zahl lebender Zellen festgestellt mit dem Trypanblau-Vitalitätstest (siehe II,14.).

In vitro propagierte P815-Zellen

Die P815-Mastozytomzellen wurden in MLC-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) von Gibco kultiviert. Je nach Bedarf für zelluläre Tests oder für Absorptionen wurden in Kulturflaschen für 5 ml Medium (Falcon Nr. 3031) oder 20 ml-Flaschen (Falcon Nr. 3013) bei einer Zelldichte von etwa 1 x 10^5/ml angezüchtet und nach etwa 4 Tagen im Brutschrank bei 37°C und 8 % CO_2 bei einer Zelldichte von etwa 1 x 10^6/ml geerntet.

9.1.4. Tuberkelbakterien (BCG)

Vitale Tuberkelbakterien des Stammes Calmette Guérin (Institut Pasteur, Paris) wurden vor Verwendung 3 x mit PBS gewaschen. BCG (Bacilles de Calmette et Guérin) wurde zur Absorption möglicher Anti-Kohlenhydrat-Antikörper-Aktivitäten der mit Complete Freunds Adjuvans (CFA) induzierten Antiseren verwendet. CFA besteht aus abgetöteten Tuberkelbakterien in Mineralöl.

9.2. Absorption

9.2.1. Absorption von kompletten Antiseren

Komplette Antiseren wurden, wie unter Ergenissen näher spezifiziert, mit 20 bis 50 Volumen-% des zu absorbierenden AS an dichtgepackten Zellen schonend gemischt und 30 min bei 37°C und 30 min bei 4°C inkubiert. Die sedimentierenden Zellen wurden mehrmals resuspendiert.
Nach zweimaligem Abzentrifugieren der Zellen 10 min bei 400 g wurden die Antiseren nach Zentrifugation bei 40000 g über 30 min in Aliquoten bei -20°C eingefroren.

9.2.2. Absorption von gereinigten Antikörpern

Gereinigte Antikörper, die aus nicht-absorbierten Antiseren gewonnen waren, wurden in einer Konzentration von 2 mg/ml in PBS-Azid stufenweise mit den angegebenen Zelltypen absorbiert. Dazu wurden AK-Lösungen 1:1 mit dichtgepackten Zellen 30 min bei 4°C inkubiert und wie oben abzentrifugiert.

10. Herstellung von Antiseren gegen µ-Ketten und µ-Ketten-Fragmente

Zur Herstellung spezifischer Antiseren gegen µ-Ketten oder definierte Teile von µ-Ketten besteht zum einen Die Möglichkeit, diese Spezifität auf der Ebene des Antiserums aus einem Antiserum gegen komplettes IgM dadurch zu erreichen, daß Aktivitäten gegen L-Ketten- und andere störende Determinanten absorbiert werden. Diese Absorption läßt sich am einfachsten durch Passage über eine Säule mit kovalent gekuppeltem Antigen erreichen (siehe II, 6.2.1.).
Der andere Weg besteht darin, die Spezifität auf der Ebene des Antigens zu definieren. Dazu ist die Isolierung von µ-Ketten bzw. deren Fragmenten zur Immunisierung nötig.

10.1. Isolierung von µ-Ketten aus polyclonalem IgM mittels präparativer SDS-Disc-PAGE

10.1.1. Präparative SDS-Disc-PAGE mit kontinuierlicher Elution

Verwendet wurde die Apparatur der Firma Quickfit (von Prof. A. Wendel, Institut für Biochemie, Tübingen, zur Verfügung gestellt) mit zylindrischem, innen und außen gekühltem Gel, deren Elutionskammer und Elektrode so umgebaut und verbessert wurde, daß bei kontinuierlicher Elution der Kreislauf eines Gegenkammerpuffers entsprechend den Angaben von Nees (84) möglich wurde. Als semipermeable Membran diente Einmachzellophan. Als Gelsystem kam das Laemmli-System, wie in II, 3.1.6. beschrieben, zur Anwendung.
Als Elutionspuffer wurde 0.125 M Trispuffer, pH 8.3, mit 10 mM Dithiothreitol (DTT, von Calbiochem, als Gegenkammerpuffer 0.37 M Trispuffer, pH 8.3. verwendet, in Anlehnung an die Vorschrift von Colora (Arbeitsanleitung zur präparativen PAGE). Testläufe mit reduziert aufgetragenen Marker-

proteinen zeigten im Eluat bei 280 nm wegen des Absorptionsbeitrags des DTT im Elutionspuffer keine verwertbare Information. Verstärkt tritt diese Störung bei der Analyse des Proteingehalts (Lowry) der Fraktionen auf.
5 mg BSA und 5 mg humanes IgG (mit 250 000 cpm I-125-MIgG als Marker) reduziert mit Mercaptoäthanol, aufgetragen, zeigte bei der Analyse des Elutionsprofils durch Messung der Extinktion bei 280 nm und Zählung der I-125-Aktivität im γ-Zähler eine unvollständige Trennung von L-Ketten (25 000 d) und γ-Ketten (50 000 d) sowie keine Trennung zwischen γ-Ketten und BSA (67 000 d). Damit erwies sich diese Methodik als ungeeignet zur Isolierung sauberer μ-Ketten aus angereicherten IgM-Präparationen.

10.1.2. Präparative SDS-Disc-PAGE mit diskontinuierlicher elektrophoretischer Elution und Adsorption an Hydroxylapatit

Zur Präparation der μ-Kette von IgM wurde das in II, 3.1.6. beschriebene Gelsystem im gleichen Elektrophoreseapparat verwendet. Im Gegensatz zu den 1.5 mm dicken Flachgelen bei analytischen Läufen wurden hier 3 mm dicke Gele verwendet. 2-3 mg vorgereinigte IgM-Präparationen wurden wie für reduzierte Gele beschrieben aufbereitet (3 ml Endvolumen) und auf das ohne Taschen polymerisierte Sammelgel unter den Elektrodenpuffer unterschichtet. Nach etwa 12 Stunden bei konstanten 100 V wurde ein Referenzstreifen aus dem Gel ausgeschnitten und 10 min gefärbt und 15 min entfärbt (Lösungen siehe II, 3.1.6.). Nach Lokalisation der μ-Bande durch Färbung eines Referenzstreifens in jedem einzelnen Gel wurde sie ausgeschnitten und elektrophoretisch eluiert.

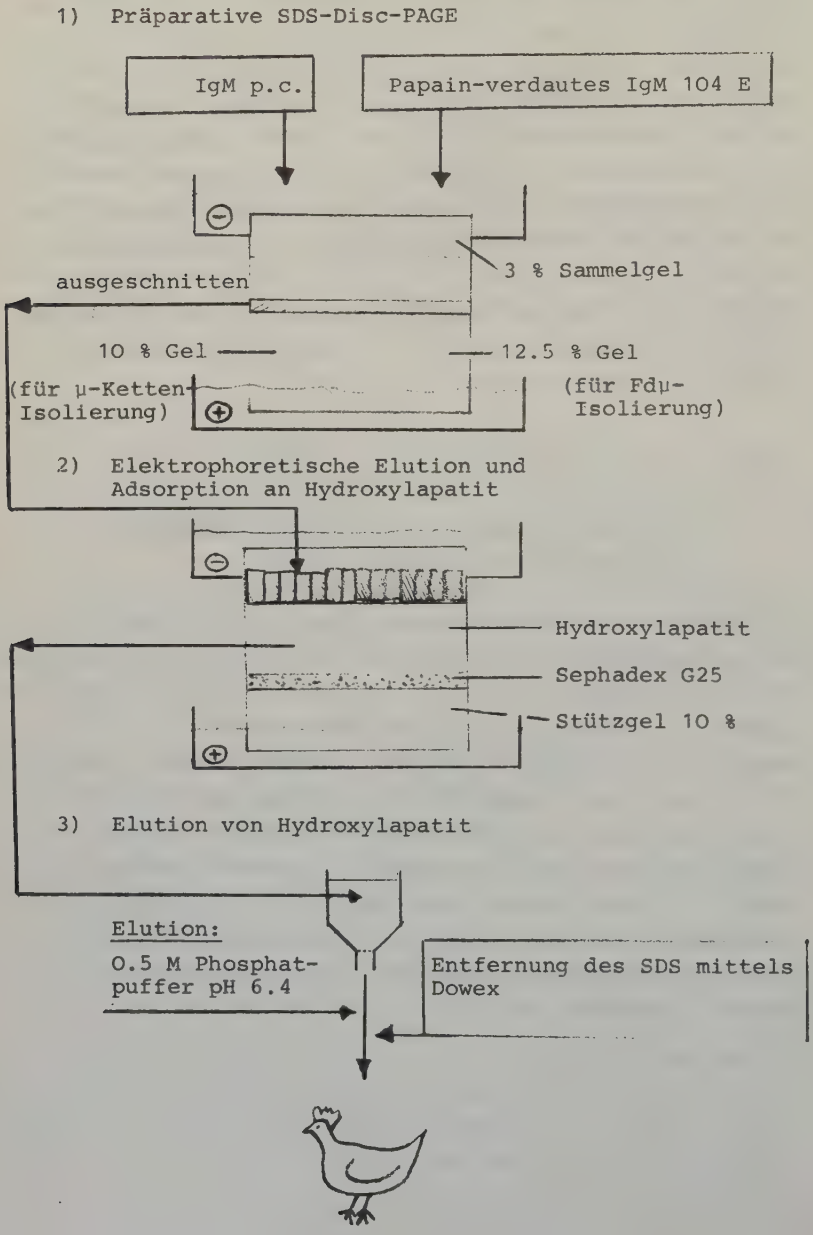
Zur elektrophoretischen Elution von SDS-Protein-Komplexen in Hydroxylapatit (Biogel HTP, Biorad, California) nach (85) wurde 0.12 M Natriumphosphatpuffer pH 6.4 mit 10 mM DTT DTT und 0.1 % SDS (= Elutionspuffer 0.12 M) verwendet.

Auf ein vorher polymerisiertes Stützgel (10 % Acrylamid) wurde erst Sephadex G25 und dann Hydroxylapatit in 0.12 M Elutionspuffer aufgetragen. Darauf wurden vorsichtig die ausgeschnittenen μ-haltigen Gelstreifen geschoben (siehe Abb. 3). Nach 15 Stunden Elution bei konstanten 60 mA und etwa 70 V (bei ∿ 15 - 20 mm langen zu eluierenden Gelstreifen) wurde der Hydroxylapatit in eine Säule transferiert, mit 0.12 M Natrium-Phosphatpuffer pH 6.4 gewaschen und mit 0.5 M Natirum-Phosphatpuffer pH 6.4 am Fraktionssammler mit UV-Schreiber eluiert. Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden eingeengt, dialysiert und ihr Proteingehalt bestimmt.
Zur Kontrolle der Vollständigkeit der Elution wurden die eluierten Gelstreifen und das Stützgel durch Coomassie Blue-Färbung auf Proteingehalt untersucht.

10.2. Entfernung von SDS aus SDS-Protein-Komplexen mittels Dowex-Ionenaustauscher

In Anlehnung an die Methode von Weber et al. (86) wurden einige der eluierten μ-Präparationen (1 mg/ml) gegen 0.05 M Trispuffer pH 7.8, 6 M Urea und 0.01 M Mercaptoäthanol dialysiert.
Nach Zugabe des halben Volumens dichtgepackten, gewaschenen Dowex-Harzes (Dowex AG1-X2, 200-400 mesh, von Biorad, Richmond, Calif.) im obigen Puffer wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Dowexharz wurde abgetrennt durch eine 5 ml Injektionsspritze, versehen mit einem Pfropf aus Glaswolle als Filter. Diese, von SDS zumindest weitgehend befreite Lösung wurde gegen PBS dialysiert und zur Immunisierung verwendet.

Abb. 3: Schema der Präparation von μ-Ketten und μ-Ketten-Fragmenten



10.3. Isolierung von Maus-μ-Ketten-Fragmenten

10.3.1. Partielle Reduktion von IgM 104E

Gereinigtes Maus IgM 104E wurde in Anlehnung an Ergebnisse von Milstein et al. (87) partiell reduziert, um das native pentamere IgM (MG ∿ 900 000 d) in monomeres IgM (MG ∿ 180 000 d) zu spalten. Damit sollten annähernd die Ausgangsbedingungen geschaffen werden, die bei der Papain-Spaltung von IgG-Molekülen vorliegen.
Nach Stickstoffbegasung wurde das in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöste IgM (0.2 M Tris-Puffer pH 8.0, 0.3 M Natriumchlorid, 10 mM EDTA) mit 0.54 mM Dithioerythrit (Clelands Reagenz, A grade, Calbiochem) versetzt.
Nach 1 Std. Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reduktion durch Carboxymethylierung mit 33 mM Endkonzentration Jodazetamid (Merck p.a., fest zugegeben, Reaktion 1 Std. bei 4°C) beendet.
Die nachfolgende Dialyse gegen 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.2 mit 20 mM EDTA diente sowohl zur Entfernung überschüssigen Jodazetamids als auch dem Pufferwechsel für die nachfolgende Papainverdauung. Der Nachweis des entstandenen monomeren IgM neben anderen Reaktionsprodukten erfolgte mit der SDS-Disc-PAGE.

10.3.2. Papainverdauung von partiell reduziertem IgM 104E

Zur Herstellung von Fab-Fragmenten des IgM wurde die von Herd et al. (88) angegebene Papainverdauung modifiziert. Papain, EC 3.4.22.2 (von Serva, Krist., reinst), ein Enzym, das vorzugsweise Peptidbindungen mit basischen Aminosäuren spaltet (89), wurde im Verhältnis von 1:50 (w/w) eingesetzt. Zur optimalen Aktivität wurde der Verdauungsansatz in 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.2 auf 20 mM EDTA und 5 mM Cystein (neutralisiert!) gebracht (90).

Zu verschiedenen Zeiten der Inkubation bei 37°C im Schüttelwasserbad wurden nun Proben entnommen und die Reaktion durch Alkylierung mit 33 mM Jodazetamid beendet.

10.3.3. Charakterisierung der Spaltprodukte

Die Analyse der Spaltprodukte erfolgte in Immunelektrophorese und SDS-Disc-PAGE. Um weitere Hinweise auf die Fab-Natur der erzeugten Bruchstücke zu erhalten, wurde das Verdauungsgemisch über eine Kaninchen-Anti-Maus-λ-Ketten-Säule absorbiert und von dieser eluiert. Dabei sollte das Fab-Fragment über die enthaltene λ-Kette retardiert werden. Zur Herstellung der gereinigten Kαλ-AK diente ein Kaninchen-αλ-Ketten Antiserum, das durch sieben subcutane Booster-Injektionen von je 200 µg gereinigten Maus-λ-Ketten (RPC 20, von Bionetics) in CFA (1 ml Emulsion) induziert wurde. Nach Adsorption der αλ-AK auf einer IgM 104E-Säule (IgM 104E besitzt leichte Ketten vom λ_1-Typ) wurden sie mit 0.5 M Ammoniumhydroxyd eluiert, neutralisiert, dialysiert und eingeengt. 102 mg dieser gereinigten AK wurden nach Spezifitätstest in der I.D. an 10 ml CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekuppelt.

10.3.4. Isolierung der "Fd"-µ-Fragmente durch präparative SDS-Disc-PAGE

Mit der in 10.1. beschriebenen Methodik wurden aus dem Papain-Verdauungsgemisch von IgM 104E mit unter reduzierenden Bedingungen gelaufenen 12.5 %-Gelen zwei µ-Fragmente von 26 000 d und 44 000 d isoliert.

10.4. Perjodatoxidation der IgM-Fragmente

Die gegen 0.12 M Phosphatpuffer pH 7.2 dialysierten Proben wurden mit dem gleichen Volumen des Puffers mit 0.02 M Natrium-meta-periodat (Merck) versetzt und in der Dunkelheit 20 Std. bei 4°C gegen 1 l obigen Puffers mit 0.01 M Na-Perjodat dialysiert (3 Pufferwechsel) zur fortgesetzten Entfernung der entstehenden Ameisensäure und des Formaldehyds. Zum Beenden der Oxidation wurden die Proben zur Entfernung noch vorhandenen Perjodats mit einem 20-fachen molaren Überschuß an Glyzerin versetzt und nach 2 Std. bei 4°C gegen PBS dialysiert.

10.5. Farbtest auf Gesamthexosen und -pentosen nach Dubois

Zum Nachweis der Effizienz der Perjodatoxidation zur Entfernung von Zuckeranteilen der IgM-Fragmente wurden die Proben mit dem Farbtest nach Dubois et al. (91) auf Zuckergehalt getestet.
Das Endvolumen des Original-Testansatzes von 7 ml wurde auf 2.5 ml reduziert, die Phenolmenge auf vergleichbare Empfindlichkeit für Pentosen und Hexosen optimiert.

Ansatz:

a) 670 µl Probenlösung (1-50 µg Zucker in PBS)

b) 20 µl Phenollösung 66 % in Wasser (Phenol p.a., Merck)

c) 1.7 ml Schwefelsäure conc. (Merck)
schnell zugeben, gut mischen.

Nach Zugabe der Schwefelsäure (Vorsicht: spritzt!) wurde nach 10-minütiger Reaktion bei der erreichten hohen Temperatur im Wasserbad bei Raumtemperatur abgekühlt (15 min). Dann wurde bei 485 nm die Extinktion gegen Reagentienleerwert im Photometer (Beckman) bestimmt. Die absoluten Mengen der Saccharidkomponente der Glycoproteine wurden mit Hilfe von Eichkurven mit reinen Zuckern bestimmt (Glukose, α-Methyl-Mannose, Galaktose).

10.6. Herstellung von Hühner-Antiseren gegen IgM-Fragmente

Jeweils 2-3 erwachsene Hühner wurden immunisiert durch Injektion von je 350 µg oxidierter oder nicht-oxidierter µ-Ketten, Fdµ 26000- und Fdµ 44000-Fragmente in CFA (je 1 ml Emulsion) in die Brustmuskulatur.
Die folgenden zwei Booster-Injektionen erfolgten im Abstand von 4 Wochen. 10 Tage nach der letzten Injektion wurden die Hühner wie in II, 5.3. beschrieben ausgeblutet.

11. Affinitätschromatographische Reinigung von Hühner Anti IgM-Fragment-Antikörpern

Gereinigte AK wurden durch Elution mit 0.5 M Essigsäure und 0.5 M Ammoniumhydroxyd von einer polyclonalen Maus IgM-Säule (siehe II, 4.2.) isoliert. Die Methodik entspricht der unter II, 6.2.2. beschriebenen. Aktivität und Spezifität wurden in der Passiven Hämagglutination (siehe II, 12.) und in der I.D. getestet.

12. Titerbestimmung der Antiseren durch "Passive Hämagglutination" (PA)

12.1. Kupplung von polyclonalem M-IgM an SRBC mit Chrom-III-Chlorid

In einer Modifikation der Methode nach Goding (92) wurden 0.5 ml gereinigtes, polyclonales M-IgM (0.8 mg/ml in 0.9 % NaCl-Lösung) einer frisch angesetzten Lösung von 4×10^{-4} M $CrCl_3$ (ausgesuchte Charge von Merck, Darmstadt) in 0.9 % Kochsalz pipettiert und dann mit 0.5 ml gepackten Schafserythrocyten (aus Hammelblut, Behring) versetzt, die 3 mal mit 0.9 % NaCl-Lösung gewaschen waren. Nach Inkubation von

einer Stunde bei 30°C und gelegentlichem Schütteln wurden die Erythrocyten 3 mal mit je 50 ml 0.9 % NaCl-Lösung gewaschen und anschließend in 1.5 ml HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Nr. 450-1200, Gibco, Bio-Cult, Karlsruhe) aufgenommen, die 2 %ig (v/v) an einer Penicillin-/Streptomycinlösung (Gibco, Bio-Cult) gemacht worden war. Für den Passiven Hämagglutinationstest wurde diese etwa 3 Tage bei 4°C haltbare Stammsuspension 1:16 mit PBS verdünnt.

12.2. Durchführung des Tests

Der Test wurde in Microtiterplatten mit V-Boden (Greiner, Nr. 651101, Nürtingen) durchgeführt. Zunächst wurden in den Platten Verdünnungsreihen der Test-Seren hergestellt. Dazu wurde mit einer Microtiter-Tropfpipette in die erste Vertiefung 150 µl PBS-Azid und in jede weitere 100 µl gegeben. Jeder Tropfen entspricht dabei ca. 25 µl. Die Zugabe von 20 µl Serum zu den 150 µl PBS-Azid (Loch 1) wurde als Verdünnung 1:8 angesehen. Mit einer 100 µl-Eppendorfpipette wurde nach mehrmaligem Mischen jeweils 100 µl entnommen (Loch 1) und in die nächste Vertiefung (Loch 2, usw. mit den vorgelegten 100 µl PBS) pipettiert, was einer Verdünnung von 1:2 entspricht. Nach Zugabe eines Tropfens der oben beschriebenen M-IgM-Erythrozytensuspension in jede Vertiefung wurde mit einem batteriegetriebenen Mikrorührer gemischt und die Platte dann mindestens 3 Std. (besser über Nacht) bei 4°C inkubiert.
Da nicht mit SRBC absorbierte Immunseren zu unspezifischer Agglutination führen können, wurden neben Kontrollen der spontanen Agglutination (ohne Serum) auch αKLH und αBSA-Seren als Kontroll-Immunseren getestet.

13. Präparation und Charakterisierung der verwendeten Zell-Populationen

13.1. Lymphknotenzellen

Aus den in Äthernarkose getöteten C57bl/6 (H-2^b) oder DBA-Mäusen (H-2^d) wurden die axillären, inguinalen und die mesenterialen Lymphknoten herauspräpariert und in TC 199 Medium (Difco, Detroit, Mich. USA) mit 0.1 % Rinderserumalbumin (Behring, Marburg) überführt. Das Lymphknotengewebe wurde dann durch 3 - 5 Hübe des Stempels eines Glas-Homogenisators nach Tenbroek (Bellco Instruments) oder durch vorsichtiges Zerreiben mit dem Plastikstempel einer Becton-Dickinson Einmalspritze in einem Haushaltssieb aus Kunststoff zerkleinert. Während dieses Vorgangs mußte das Sieb in Medium getaucht bleiben. Die Zellsuspension wurde anschließend 2 mal mit je 10 ml TC-Medium gewaschen (7 min, 150 x g). Zellaggregate wurden durch Filtration der Suspension durch ein feines Stahlnetz (150 Maschen/mm^2, Fa. Weisse & Eschrich, Ludwigsstadt) oder durch eine doppelte Lage Mull (Regal, Filmated Swabs, Johnson & Johnson) entfernt. Die gesamte Zellpräparation fand bei 0^oC (Eiskühlung) statt. Die Zellzahl der monozellulären Suspension wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (etwa 3 x 10^7 pro Maus) und auf die gewünschte Zelldichte eingestellt. Die Zahl der vitalen Zellen, bestimmt mit dem Trypanblau-Test (siehe II, 14.), lag normal bei über 95 %.

13.2. Thymuszellen

Thymuszellen wurden entsprechend präpariert. Die Zahl der geschädigten Zellen war meist kleiner als 5 %, die Ausbeute pro Maus lag bei 1 - 2 x 10^8 Zellen.

13.3. Milzzellen

Milzzellen wurden entsprechend präpariert. Die Ausbeute pro Maus betrug 1 - 2 x 10^8 Zellen; ihre Vitalität war im Trypanblau-Test > 95 %.

13.4. Periphere T-Zellen

13.4.1. Nylon-Wolle-Absorption

Periphere T-Lymphozyten wurden durch Passage von Milzzellen durch Nylon-Wolle (LP1, Leukopakfilter, Fenwal Inc., Walter Kidde & Co., Ashland, Mass.) angereichert. Die Methode wurde im wesentlichen von Kramer et al. (93) übernommen, die eine Modifikation der Technik von Julius et al. (94) darstellt.
Als Säulen dienten 10 ml Luer-Plastikspritzen, die mit 1.6 g Nylonwolle dicht gepackt wurden. Vor Benutzung wurden sie mit 50 ml PBS, dann mit 10 ml PBS/5 % FKS (hitzeinaktiviert bei 56°C/40 min) gespült. Nach Inkubation für mindestens 1 Std. bei 37°C wurde mit 50 ml PBS/5 % FKS bei 37°C gewaschen. 1.25 x 10^8 Milzzellen (Präparation siehe 13.3.) in 2 ml PBS/5 % FKS wurden bei 37°C aufgetragen und mit 2 ml PBS/5 % FKS in die Säule gespült.
Nach 45 min bei 37°C wurden die nicht-adhärenten Zellen (T-Zellen) mit 50 ml PBS/5 % FKS bei 37°C ausgewaschen, abzentrifugiert (10 min, 150 g), gezählt und ihre Vitalität getestet. Danach wurde die so erhaltene Zellpopulation ein zweites Mal über eine Nylon-Säule absorbiert.
Diese hochangereicherten T-Lymphozyten (periphere T-Zellen) waren zu mehr als 90 % Trypanblau-negativ.

13.4.2. Lyse der Erythrozyten mit Ammoniumchlorid

Zur Jodierung verwendete periphere T-Zellen wurden noch zusätzlich von den kontaminierenden Erythrozyten befreit. Diese wurden durch 10-minütige Inkubation von 7 x 10^8 Milzzellen in 10 ml Lysepuffer bei Raumtemperatur lysiert (modifiziert nach Kay et al. (96)).
Zusammensetzung des Lyse-Puffers:

NH_4Cl	8.3 g
$KHCO_3$	1.0 g
EDTA	0.0372 g (Titriplex III)

ad 1000 ml Aqua dest.
mit 5 n KOH auf pH 7.4 einstellen.

Die Lyse wurde durch Verdünnen des Ansatzes mit 50 ml Medium beendet.
Nach zweimaligem Waschen der Lymphozyten wurden diese über einen Ficoll-Gradienten (siehe II, 9.1.1.) der Dichte 1.08 g/ml für 30 min/400 g bei 20°C zentrifugiert. Die von der Interphase mit einer Spritze abgesaugten Lymphozyten wurden (mit Medium dreimal gewaschen) in PBS/5 % FKS aufgenommen, gezählt und mit Trypanblau getestet (> 95 % vital). Danach folgte die Anreicherung der T-Lymphozyten durch zweimalige Passage über Nylon-Wolle (siehe 14.4.1.).

13.4.3. Charakterisierung der peripheren T-Zellen

Zur Bestimmung des T-Zell-Charakters und der Reinheit der erhaltenen Zellpopulation wurden in der indirekten Immunfluoreszenz die Zahl der kontaminierenden Oberflächen-Ig positiven Zellen (B-Zellen) mit Kaninchen-Anti-μ-AS und Kaninchen-Anti-Ig-AS bestimmt.
Der positive Nachweis des T-Zell-Charakters wurde durch Komplement-Lyse mit Maus-Anti-Theta-Antiserum geführt. (Dieser Test wurde freundlicherweise bei Dr. H. Rodt im Institut für Hämatologie, München, durchgeführt). Die Technik entspricht der in III, 19. beschriebenen Mikromethode.

13.5. Milzzellen von nackten Mäusen

Milzzellen von "nackten" Mäusen, einer Mutation, die neben anderen Defekten keinen Thymus und keine reifen T-Lymphozyten besitzt (151), dienten als Quelle für "reine" B-Lymphozyten. Ihre Präparation ist analog der normaler Milzzellen (siehe II, 13.3.).

13.6. T-Lymphom-Zellen der Linien WEHI 7 und WEHI 22

Die von Harris et al. (95) beschriebenen Thymom-Linien, durch Bestrahlung in Thymi von BALB/c-Mäusen induziert, tragen beide das Theta-Antigen. Die WEHI 22-Linie produziert IgM und besitzt einen schwachen Fc-Rezeptor im Gegensatz zur WEHI 7-Linie ohne Ig-Produktion und Fc-Rezeptor. Beide Linien wurden freundlicherweise von Dr. D. Haustein, Institut für experimentelle Immunologie, Marburg, zur Verfügung gestellt. Sie wurden in vitro unter den gleichen Bedingungen wie die P815-Mastozytomzellen gezüchtet (siehe II, 9.1.3.) und bei einer Grenzkonzentration von 10^6 Zellen/ml umgesetzt.

13.7. MLC-Blasten

In der unter 19.1. beschriebenen gemischten Lymphozytenkultur (MLC) wurden T-Lymphozyten spezifisch gegen die Alloantigene der Stimulatorzellen aktiviert. Die in normalen Populationen nur zu wenigenProzent vorhandenen, spezifisch mit diesen Alloantigenen reaktiven T-Zellen vermehren sich stark durch die Proliferation in der MLC (150). Dabei vergrößern sich die kleinen Lymphozyten zu mindestens doppelt so großen Lymphoblasten, die dann durch Sedimentation bei Erdanziehung (1 g) in einem 0.6 - 2 % BSA-Gradienten in PBS von den kleinen Lymphozyten getrennt wurden (149).

Bei Auftrag von 5 x 10^8 MLC-Zellen auf einen Gradienten von 500 ml Volumen wurden 2 x 10^8 hochangereicherte Blasten erhalten, die durch Zentrifugation über einen Ficoll-Gradienten (siehe II, 9.1.1.) von Erythrozyten- und toten Zellen befreit wurden. Von der Interphase wurden 8 x 10^7 zu > 95 % aus Blasten bestehende, vitale Zellen (> 98 % Trypanblau negativ) erhalten, die dann nach Oberflächen-Jodierung zur Immunpräzipitation verwendet wurden. Der Grund für die Verwendung von T-Lymphoblasten liegt in der Vorstellung begründet, daß auf diesen hochangereicherten, spezifisch Alloantigen-erkennenden T-Lymphozyten eventuell auch mehr Antigen-Rezeptoren exprimiert sind als auf kleinen Lymphozyten.

14. Der Trypanblau-Test

Zunächst wurde eine 0.2-prozentige Trypanblaulösung in destilliertem Wasser hergestellt. 4 Teile dieser Stammlösung wurden mit einem Teil einer 4.25-prozentigen NaCl-Lösung verdünnt, um isotonische Bedingungen zu schaffen. Nach (20) geht man so vor, da das Trypanblau (4,4'-Bis(8-amino-3,6-disulfo-1-hydroxy-2-naphtylazo)-3,3'-dimethylbiphenyl-Na_4) in Anwesenheit anderer Ionen nur schlecht löslich ist. Die zu zählende Zellsuspension wurde dann im Verhältnis 1:1 mit der Färbelösung versetzt. Nach einigen Minuten wurden 10 µl dieser Suspension im Volumen von 0.1 mm^3 einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Der prozentuale Anteil toter Zellen, d.h. Zellen, deren Zellkern blau angefärbt war, wurde so ermittelt.

15. Indirekte Immunfluoreszenz (IF)

In der indirekten IF wird die Bindung von Antikörpern (Anti-IgM) auf Zelloberflächenantigenen vitaler Zellen untersucht. Bindende AK werden sichtbar gemacht durch Zugabe eines zweiten AK (oder AK-Fragments), der spezifisch auf dem ersten AK bindet und der mit fluoreszierenden Farbstoffen (Fluoreszein, Rhodamin) markiert ist.

15.1. Technik der indirekten IF

2 x mit Hanks-Medium gewaschene Zellen (1.5×10^6) wurden abzentrifugiert (7', 140 g) und mit 20 µl gereinigtem Antikörper (2 mg/ml in PBS) versetzt, gemischt und 30 min inkubiert. Diese Inkubation und alle weiteren Schritte fanden im Eisbad bei 0^oC statt, um "capping" der Oberflächenantigene und eventuellen Verlust durch "shedding" oder Endozytose zu verhindern.
Nach Resuspendieren wurde 2 x mit 1 ml eiskaltem Hanks-Medium gewaschen, abzentrifugiert und zum Zellpellet 20 µl zweiter Antikörper zugegeben. Dieser war bei Kaninchen AS oder AK ein Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC) gekuppelter Ziege-Anti-Kaninchen-Immunglobulin Antikörper (Nordic), 1:8 mit Hanks-Medium verdünnt. In Proben mit Hühner AS oder AK wurde ein selbst präparierter TRITC-$KF(ab')_2$ αHüIg Antikörper (siehe II, 13.2.) in der Konzentration 0.025 mg/ml verwendet. Durch das Fehlen des Fc-Teils des IgG-Moleküls im $F(ab')_2$-Fragment sind falsch-positive Ergebnisse durch Bindung des markierten Antikörpers via Fc-Rezeptoren der Lymphozyten ausgeschlossen. Nach vorsichtigem Resuspendieren wurde weitere 30 min bei 0^oC im Dunkeln inkubiert. Die Lichteinwirkung wurde vermieden, um das Ausbleichen der fluoreszierenden Farbstoffe zu verhindern. Nach zweimaligem Waschen mit Hanks-Medium wurde der Überstand abgesaugt und das Zellsediment in 10 µl einer Mischung von 1 Teil PBS Azid und 9 Teilen Glyzerin (Merck) aufgenommen. Nach vor-

sichtigem, möglichst quantitativem Resuspendieren wurde ein Tropfen auf einen Objektträger gebracht und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Untersuchung der Zellen erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (ORTHOPLAN, von LEITZ, Ploem-Illuminator) im Auflicht. Ig-positive Zellen zeigten deutliche grüne (FITC) oder orange (TRITC) Ringfluoreszenz. Als positive Zellen wurden nur solche gezählt, deren Fluoreszenz über der Anti-KLH-Kontrolle lag. Es wurden jeweils 50 bis 150 Zellen ausgezählt und der Prozentsatz positiver Zellen berechnet.

15.2. Präparation des TRITC-Kaninchen $F(ab')_2$-Anti-Hühner-Ig-Antikörpers

15.2.1. Isolierung des Kaninchen-Anti-Hühner-Ig-Antikörpers

Immunserum eines Kaninchens, das mit sechs Booster-Injektionen von 1 mg Hühner Ig, Cohn II-Fraktion (von Miles) in 1 ml CFA-Suspension immunisiert war, diente zur Isolierung des gereinigten KαHIg-AK über eine Immunosorbent-Säule, auf der 100 mg HüIg,Cohn II gekuppelt war. Nach Auftrag von 10 ml Antiserum und Spülen mit PBS Azid wurde mit 0.5 M Essigsäure 20 mg aktiver Antikörper eluiert und im Ouchterlony getestet. Ca. 130 mg so präparierten Antikörpers wurden an eine Protein A-Säule gebunden und wieder mit 0.5 M Essigsäure eluiert zur Selektion auf Protein-A bindende AK-Spezies.

15.2.2. Pepsin-Verdauung zur Herstellung des $F(ab')_2$-Fragments (modifiziert nach (97))

Ca. 110 mg AK (11 mg/ml) in 0.2 M Natrium-Azetat-Puffer pH 4.3 wurden mit 5.5 mg Sepharose-gebundenem Pepsin 20

Stunden bei 37°C im Schüttelwasserbad verdaut. Das Pepsin (von Serva) mit einer Aktivität von 30 Anson Einh./mg wurde nach (98) in Zitratpuffer pH 4.5 an CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekuppelt (50 mg/20 ml Sepharose). Die Verdauungsprodukte wurden nach dem Abzentrifugieren der Pepsin-Sepharose in Immunelektrophorese und SDS-Disc-PAGE analysiert.

15.2.3. Reinigung von K-F(ab')$_2$-Fragmenten mit Protein A

Zur Trennung von F(ab')$_2$-Fragmenten von Fc-Teilen und unverdautem IgG wurde das Verdauungsgemisch über eine Protein A-Säule passiert. Dabei wurden Fc-Teile und komplette IgG-Moleküle quantitativ gebunden, das Effluens enthielt das gereinigte F(ab')$_2$-Fragment. Die Reinheit des F(ab')$_2$ wurde in der SDS-Disc-PAGE im 5 %-Gel überprüft, die Antikörperaktivität in der I.D. getestet.

15.2.4. Konjugation von K-F(ab')$_2$ α Hühner-Ig mit Tetramethyl-Rhodamin-Isothiozyanat (TRITC) nach Akiyoshi (99)

26 mg K-F(ab')$_2$ α HIg in 0.1 M Carbonat-Puffer pH 9.6 wurden mit 780 µl TRITC-Lösung tropfenweise versetzt und reagierten über Nacht bei 4°C unter Rühren in der Dunkelheit. TRITC-Lösung: 1.048 mg TRITC (von Serva) wurden in 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO, von Merck) gelöst. Die klare Lösung wurde mit 0.1 M Na_2CO_3-Puffer pH 9.6 auf 1.05 ml aufgefüllt.

Nach Zentrifugation (20 min/40000 g) wurde das Reaktionsgemisch auf eine Sephadex G25-Medium Säule (2 x 36 cm) in PBS-Azid aufgetrennt. Sie diente dazu, markiertes F(ab')$_2$ (im Ausschlußvolumen) von überschüssigem Rhodamin und eventuell noch vorhandene niedermolekulare Verdauungsprodukte abzutrennen.

16. Zyto-Radioautographie (RAG)

Zum Nachweis von Anti-µ-Antikörpern, die auf der Zelloberfläche binden, wurde neben der Indirekten Immunfluoreszenz auch die empfindlichere, direkte Zyto-Radioautographie verwendet. Dabei werden radiojodierte Antikörper, die auf Zellen gebunden haben, im Zell-Ausstrich durch Schwärzung der auf den Objektträger aufgebrachten Fotoemulsion nachgewiesen.

16.1. Chloramin-T-Jodierung gereinigter Antikörper

Gereinigte AK spezifisch gegen µ-Ketten (Präparation siehe II, 6.2.) wurden mit I-125 (0.1 mCi I-125 pro 50-100 µg AK in 10 µl PBS-Azid) nach der Chloramin-T-Methode von Hunter und Greenwood (115) jodiert.
Dazu wurden 100-500 µg des Proteins in 10-50 µl PBS in ein 1 ml-Eppendorf-Gefäß gegeben. Durch Schräghalten des Röhrchens konnten die Reaktionspartner Natriumjodid (10 µl, entsprechend 0.1 - 1 mCi, siehe II, 17.1.2.) und Chloramin T (10 µl, entsprechend 0.05 mg, von Merck) vorsichtig auf die Röhrchenwand pipettiert werden, ohne daß sie sich vermischten. Gestartet wurde die Reaktion durch kurzes Mischen auf einem Whirl-Mix; nach 1-2 min wurde sie durch die Zugabe von $Na_2S_2O_5$ (10 µl, entsprechend 0.05 mg, von Merck) beendet. Nach dem Auffüllen der Probe auf 150 µl mit 10 % FKS in PBS wurde sie zum Entsalzen auf eine Sephadex G25-Säule (PD2 von Pharmacia, 8 x 25 mm, 1.5 ml Bettvolumen) aufgetragen. Mit weiteren 400 µl PBS wurde die Säule abgesättigt, bevor die Elution des jodierten Proteins mit 350 µl PBS erfolgte.

16.2. Durchführung der RAG

2×10^6 Lymphozyten wurden mit 10 µl radiojodierter AK-Lösung (auf 100 µl mit Hanks-Medium verdünnt) für 30 min bei $4^{\circ}C$ inkubiert. Nach 4-maligem Waschen mit 1 ml Hanks-Medium/ 5 % FKS wurden die Zellen in 10 µl FKS aufgenommen und je 1 Tropfen auf drei mit Chromschwefelsäure gereinigten und mit Gelatine beschichteten Objektträgern ausgestrichen. Der getrocknete Ausstrich wurde 10 min in Methanol bei Raumtemperatur fixiert.

"Dippen"

In der Dunkelkammer wurden die Objektträger in auf $50^{\circ}C$ erwärmte, luftblasenfreie (!) Photoemulsion (K5, von Ilford) getaucht und bei Raumtemperatur getrocknet.
Nach Expositionszeiten zwischen einem Tag und zwei Wochen wurden die Präparate 6 min bei $20^{\circ}C$ entwickelt (Entwickler Kodak DAB), 4 min gewässert und 10 min fixiert (Unifix-Fixierbad von Kodak).

Die folgende GIEMSA-Färbung der ausgestrichenen Zellen wurde wie folgt durchgeführt:
Giemsa-Stammlösung (von Merck) wurde mit Zitrat/Phosphat-Puffer pH 5.5 (0.01 M Zitronensäure, 0.02 M Di-Natriumhydrogenphosphat) im Verhältnis 1:8 gemischt. In dieser Lösung färbten die Objektträger 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde ca. 10 min mit fließendem Wasser gespült und getrocknet.

Die Auswertung erfolgte mit dem Mikroskop im Durchlicht. Es wurden etwa 100 Zellen ausgezählt. Als Positiv wurden Zellen mit schwarzen Silberkorn-Massierungen über Hintergrund und Kontrollserumniveau gezählt.

17. Immunpräzipitation I-125-markierter Zelloberflächen-Proteine und deren Analyse in der SDS-Disc-Polyacrylamidgelelektrophorese

17.1. Laktoperoxidase (LPO) katalysierte Jodierung vitaler Zellen mit I-125

Ursprünglich wurde die Radiojodierung exponierter Membranproteine mit LPO von Philipps et al. (100) für Erythrozyten entwickelt.
Die bevorzugte Markierung exponierter Membranproteine kann erklärt werden durch die beschränkten Möglichkeiten des 82 000 d schweren LPO-Moleküls, in die Zelle einzudringen. Auch die Kurzlebigkeit der gebildeten Jod-Radikale könnte mit für die vektorielle Jodierungscharakteristik verantwortlich sein. Marchalonis et al. (101) und Baur et al. (102) haben die LPO-Radiojodierung auf Lymphozyten und auf Lymphom-Zellen (Haustein, 103) übertragen.

17.1.1. Reinigung der Laktoperoxidase

Ionenaustausch-Chromatographie mit Amberlite

Nach der Methode von Morrison und Hultquist (104) wurden 15 l entrahmter Milch mit 225 g gewaschenem Ionenaustauscher (Amberlite, Na-CG 50 Typ 2) gemischt und 2-3 min gerührt, bevor der pH von 7.0 mit 6 N Essigsäure eingestellt wurde. Dann wurde weiter für 1 Std. gerührt, bevor sich der Ionenaustauscher wieder absetzen konnte. Der Überstand wurde dekantiert und wieder mit 112.5 g Ionenaustauscher versetzt, pH 7.0 eingestellt und eine weitere Stunde gerührt, dann absitzen gelassen. Diese Isolierungsschritte fanden bei 4°C statt. Anschließend wurde die gesamte Menge an CG 50 mit Aqua dest. vorgewaschen. Dann wurde eine Glassäule (6 x 45 cm) mit dem CG 50-Gemisch gefüllt und mit Aqua dest. eluiert, bis das Eluat klar und frei von Protein war (Extink-

tion bei 280 nm kleiner 0.02). Das Enzym, als grünes Band sichtbar, wurde mit 0.5 M Natriumacetat-Puffer pH 5.0 bei Raumtemperatur eluiert. Die vereinigten, LPO-haltigen Fraktionen (62.5 mg Protein in 85 ml) zeigten in dem als Reinheits-Index eingeführten Absorptionsverhältnis bei 412/280 nm den Wert 0.42 und präsentierten noch etwa 70 % der LPO-Ausgangsaktivität.

Ammoniumsulfat-Fällung

Diese LPO-Präparation wurde mit 53 g Ammoniumsulfat pro 100 ml Lösung bei 4°C unter Rühren gefällt. Die Lösung blieb 2 Std. in der Kälte stehen und wurde dann 20 min bei 20000 x g zentrifugiert. Die Präzipitate wurden in wenig Aqua dest. resuspendiert und gegen 5 l Aqua dest. über Nacht dialysiert. Nach Einstellung des pH auf 7.0 mit Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 wurde wieder 30 min bei 2o000 x g zentrifugiert. Die so gewonnene Laktoperoxidase (28 mg) zeigte im Spektrophotometer ein 412/280 nm Absorptionsverhältnis von 0.65 und repräsentierte noch etwa 50 % der Ausgangsaktivität.

Ionenaustausch-Chromatographie mit CM-Cellulose

Zur Weiterreinigung wurde CM-Cellulose mit 0.01 M Azetatpuffer pH 5.7 äquilibriert. 6 mg vorgereinigte LP wurden aufgetragen und mit einem linearen Azetatpuffergradienten pH 7.0 von 0.01 M bis 0.25 M eluiert. Die zwischen 0.16 M und 0.19 M Azetatpuffer eluierte LPO-Fraktion (4.25 mg) zeigte ein 412/280 nm Absorptionsverhältnis von 0.70 und stellte auf 23 mg Ansatz hochgerechnet noch etwa 40 % der Ausgangsaktivität dar.
Dieses LPO-Präparat wurde in 250 µg Aliquots in Ampullen lyophilisiert, zugeschmolzen und bei -80°C gelagert.

Bestimmung der Laktoperoxidase-Aktivität

Nach einer von Dr. P. Wernet (105) übernommenen Methode wurden 14.3 mg Dopamin (3-Hydroxy-thyramin-hydrochlorid, von Fluka) in 43 ml PBS gelöst und 1 ml H_2O_2 (30 %iges Wasser-

stoffperoxid von Merck, 1:1000 verdünnt) hinzugefügt (Lösung A). 250 µg lyophilisierte Lakotperoxidase wurden in 250 µl Aqua dest. gelöst (Lösung B). Gestartet wurde die Reaktion durch Mischen von 2.9 ml Lösung A und 10 µl (bzw. 30 µl, 50 µl) Lösung B in einer Photometer-Küvette (Lichtweg: 1 cm). Bei Raumtemperatur wurde nun alle 15 Sek. die Extinktion im Spektrophotometer bei 475 nm gegen Leerwert gemessen.
Eingesetzt wurde die Laktoperoxidase zur Jodierung in der Konzentration, die in diesem Versuchsansatz nach 60 Sek. zu einer Extinktion von etwa 0.05 (106) führte (Abb. 4).

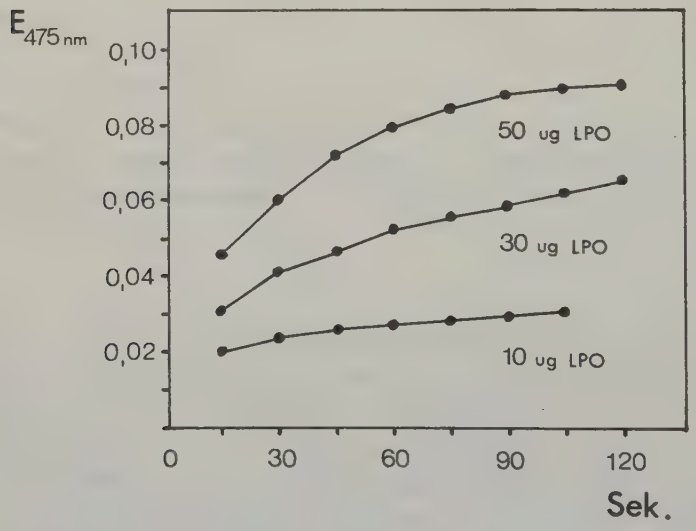


Abb. 4: Bestimmung der Lactoperoxidase-Aktivität

17.1.2. Durchführung der Jodierung mit Laktoperoxidase

Bei der enzymatischen Jodierung wurden verschiedene Parameter wie Reaktionszeit und die Konzentrationen der Reaktionskomponenten variiert. Folgender Ansatz erwies sich für Thymom-Zellen, Mastozytom-Zellen und MLC-Blasten (siehe II, 13.7.) als günstig. 2 x 10^7 dreimal in PBS gewaschene Lymphozyten wurden in 50 ml-Reaktionsgefäßen (Falcon, Nr. 2070) in 1 ml PBS resuspendiert. Hinzugefügt wurden 20 µl I-125 in NaOH, pH 8-11 (IMS 30, Radiochemical Centre Amersham, England), entsprechend 2 mCi, und 30 µg Lactoperoxidase in PBS. Gestartet wurde die Reaktion im Wasserbad bei 30°C durch die Zugabe von 20 µl 0.03 % H_2O_2 (Perhydrol, von Merck, 1/1000 verdünnt in PBS). Während der 16-minütigen Reaktionszeit wurde gut geschüttelt und im Abstand von je 4 min weitere 30 µg LPO und 20 µl H_2O_2 zugegeben. Gestoppt wurde die Reaktion nach insgesamt dreimaliger Zugabe von 35 µg LPO und viermaliger von 20 µl H_2O_2 mit 20 ml eiskalter PBS (nach Hubbard (108)).
Alternativ wurde für kleine Lymphozyten der Jodierungsansatz von Marchalonis et al. (101) mit einmaliger Zugabe von 10 µg LPO, 10 µl I-125 und 10 µl H_2O_2-Verdünnung zu 7 x 10^6 Zellen (in 200 µl PBS) bei einer Reaktionsdauer von 10 min bei 25°C durchgeführt. Die Abhängigkeit der Jod-Bindung von der Gesamt-Jod-Konzentration wurde durch Zugabe verschiedener Mengen "kalten" Jods-127 getestet. Die Menge des an die Membran gebundenen Jod-125, im folgenden als "Zellgebundene Aktivität" bezeichnet, wurde im Gamma-Szintillationszähler (Autogamma, Searle, Nuclear Chicago) bestimmt, wobei pro Probe nicht mehr als 5 x 10^5 cpm eingesetzt wurden. Als Kontrollen wurden Jodierungen ohne LPO bzw. ohne H_2O_2 angesetzt.

17.2. Solubilisierung der markierten Membran-Proteine

Für die Solubilisierung wurde das nicht-ionische Detergens Triton X-100 (Octylphenoldecaäthylenglykoläther, von Serva) gewählt, um eine völlige Denaturierung und eventuelle Zerstörung der antigenen Determinanten, wie sie z.B. durch SDS sehr wahrscheinlich ist, zu verhindern.
Die Konzentration von 0.05 bis 0.1 % wurde von Cone et al. (122) als essentiell für die Solubilisierung von T-Zell-Immunglobulin beschrieben.
Zur Lyse von T-Lymphozyten wurde folgende Lösung benutzt: 0.05 M Tris-Puffer pH 8, mit 0.15 M Natriumchlorid und 10 mM EDTA, 20 mM PMSF (Proteaseninhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid, von Sigma) sowie 0.1 % Triton X-100.
Die Lyse von B-Zellen erforderte 0.5 % Triton X-100 in obigem Puffer zur optimalen Ausbeute an Oberflächen-Ig (122). Alternativ wurde auch Solubilisierung nach Cone et al. (122) mit 10 M Harnstoff, 1.5 M Essigsäure und 0.1 % NP40 (nicht-ionisches Detergenz wie X-100) sowie PMSF versucht. 2 x 10^7 LPO-jodierte Zellen wurden jeweils 30 min bei $4^{\circ}C$ unter gelegentlichem Schütteln in 1 ml Lysepuffer lysiert. Die nicht gelösten Zellfragmente wurden durch 20-minütige Zentrifugation bei 20000 g und $4^{\circ}C$ sedimentiert.
Entsalzung über G25. Der Überstand wurde über eine kalibrierte Sephadex G25-Fertigsäule (1.3 x 5 cm, PD 10 von Pharmacia) von nicht-gebundenem Jod befreit. 2 ml Solubilisat wurden aufgetragen, mit 0.5 ml PBS-Azid gespült und das Ausschlußvolumen mit 3.5 ml PBS-Azid eluiert. Dieses Eluat (als "Ausschlußvolumen G25" bezeichnet) wurde in 50-150 µl-Mengen direkt zur TCA-Präzipitation bzw. Immunpräzipitation eingesetzt.

17.3. TCA-Präzipitation markierter Proteine

Zur Feststellung des kovalent an Protein gebundenen Jods wurde die mit Trichloressigsäure (TCA) präzipitierbare Radioaktivität ermittelt.
Dazu wurden 20 µl des Membran-Solubilisats mit 5 ml 5 % TCA (von Merck, p.a.) und 5 mM Kaliumjodid (von Merck, p.a.) 1 Std. auf Eis inkubiert. An das Absaugen durch ein Millipore-Filter (SM 13400, von Sartorius) schloß sich das Waschen des Filters mit 5 ml 5 % TCA/5 mM KI-Lösung, mit 5 ml 5 % TCA (zweimal) und mit 5 ml absolutem Äthanol (einmal) an. Anschließend wurde die Radioaktivität des Filters im γ-Szintillationszähler bestimmt.

17.4. Immunpräzipitation der radiojodierten Zelloberflächenstrukturen

Die von den Anti-µ-Antikörpern erkannten, radioaktiv markierten Oberflächenstrukturen wurden mit Hilfe der Immunpräzipitation selektiv angereichert.
Um bei der Präzipitation durch spezifische Antikörper sicherzustellen, daß die Präzipitation auch quantitativ erfolgt, wurde in allen Fällen mit der "Sandwich"-Methode gearbeitet, d.h.: die Zelloberflächenantigen-Antikörper-Komplexe der ersten Reaktion wurden mit einem zweiten Reagenz copräzipitiert. Zum einen wurde ein zweiter Antikörper mit Spezifität gegen den 1. AK eingesetzt. Der Anquivalenzbereich wurde mit Hilfe der I.D. bestimmt.
Darüber hinausgehend wurde noch zusätzlich zum 2. AK die Co-Präzipitation mit Staphylococcus aureus verwendet. Sie hat sich als schneller und besser reproduzierbar erwiesen und wurde deshalb in einem großen Teil der Versuche eingesetzt.
Der Staphylococcen-Stamm Cowan I läßt sich als zusätzliches Reagenz in der Immunpräzipitation verwenden, weil das Protein A in seiner Membran die Fc-Region des Kaninchen-IgG

mit hoher Affinität bindet (109,110).
Alle Präzipitationen fanden in Eppendorf-Mikroreaktionsgefäßen statt, die mit Silicon (1 %iges Siliclad; von Becton, Dickinson & Co.) beschichtet waren, um die Adsorption an die Gefäßwände möglichst gering zu halten.

17.4.1. Co-Präzipitation mit zweitem Antikörper

Die Membransolubilisate als Antigen (1 - 5 x 10^6 cpm) wurden mit dem ersten Antikörper, d.h. dem Antiserum oder den daraus isolierten spezifischen AK, in unterschiedlichen Mengen 30-60 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde als zweiter Antikörper ein Kaninchen-anti-Hühner-Serum in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Proben standen über Nacht bei 4°C und wurden dann 20 min bei 2000 g zentrifugiert. Die Präzipitate wurden mit kalter PBS drei- bis viermal gewaschen, anschließend ihre Radioaktivität im γ-Zähler bestimmt und ihre Zusammensetzung im SDS-Gel analysiert.

17.4.2. Zusätzliche Präzipitation mit Staphylococcus aureus (Staph. A.)

Zur Einsparung der Über-Nacht-Inkubation bei 4°C und zur Sicherstellung der quantitativen Präzipitation wurde nach der 37°C Inkubation des 2. AK Staph. A zugegeben. Die bei AK verschiedener Säugetierspezies mögliche (110), alternative Benutzung von Staph. A als 2. AK war im meist benutzten Präzipitationssystem mit Hühner-AS oder -AK nicht möglich, da Staph. A nur teilweise an via Antigen-Bindung in der Konformation verändertes Hühner-Fc und nicht an normales Hühner-Fc bindet (111). Hier wurde die Methode von Kessler (112,113) verwendet: Die Formalin-fixierten und Hitzeinaktivierten Staphylococcen (von Dr. W. Bessler, Institut

für Mikrobiologie, Tübingen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt) lagen in einer 10 %igen Suspension vor. Vor der Präzipitation wurden sie bei Raumtemperatur 15 min in 0.5 %igem NP40-NET-Puffer (NET: 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, 0.02 % Natriumazid, pH 7.4) inkubiert, dann einmal mit 0.05 %igem NP40-NET-Puffer gewaschen (10 min/ 2000 g) und im Volumen der Original-10 % Suspension in 0.05 %igem NP40-NET-Puffer mit 1 mg pro ml BSA und 5 mM Kaliumjodid resuspendiert. Mit 1. und 2. AK copräzipitierte Proben wurden nach Zugabe von je 50-200 µl 10 %iger Staphylococcen-Suspension nochmals 45 min bei 4°C inkubiert und anschließend dreimal mit je 1 ml kaltem 0.05 %igem NP40-NET-Puffer gewaschen (10 min/2000 g) und in 50-180 µl "Final Sample Buffer" und Mercaptoäthanol aufgenommen. Durch 3-5 minütiges Kochen und Zentrifugation (15 min/ 5100 g) konnten Staphylococcen und Immunkomplexe getrennt werden. Diese Staphylococcen-Eluate wurden nach der Bestimmung ihrer Radioaktivität im SDS-Gel aufgetrennt.
Als Kontrollen wurden bei diesen Versuchen als 1. AK Normales Hühnerserum und gereinigtes Hü-Ig sowie Hü-αKLH-Serum und gereinigte Hü-αKLH-AK verwendet.

17.5. Analyse der Präzipitate mit SDS-Disc-PAGE in Röhrchengelen mit anschließendem "Schneiden" der Gele

Polyacrylamid-Gele der in II, 3.1.6. beschriebenen Zusammensetzung wurden im Glasröhrchen der Dimension 0.5 x 12 cm polymerisiert. Nach der Elektrophorese wurden die Gele auf einem automatischen Gel-Schneider (Gilson Instruments) in ca. 60 Fraktionen zerlegt und deren Radioaktivität im γ-Zähler bestimmt.

17.6. Analyse der Präzipitate mit SDS-Disc-PAGE in Flachgelen mittels Radioautographie (Fluorographie)

Radioautographie

Radioaktiv markierte Proteine im getrockneten SDS-Gel wurden mit Hilfe der Radioautographie sichtbar gemacht. Das Gel wurde in einer lichtdichten Kassette mit einem Kodak "X-Omat-R" Röntgenfilm für 3 Tage bis 6 Wochen exponiert. Die Filme wurden in einem Entwicklungsautomaten (Dupont, in Chir. Klinik der Universität Tübingen) entwickelt.

"Fluorographie"

Nach Laskey und Mills (75) können Röntgenfilme durch einen Lichtblitz vor der Exposition mit radioaktiven Gelen so stark sensibilisiert werden, daß die nötige Expositionszeit sich um das 16-fache verkürzt. Die so vorbehandelten Filme müssen allerdings bei $-70^{\circ}C$ aufbewahrt werden. Bei dem benutzten Kodak "X-Omat-R"-Film, der mit den jodierten Proteinen im SDS-Gel exponiert wurde, zeigte sich jedoch, daß sich die Expositionszeiten nur auf etwa die Hälfte verkürzen lassen, bei folgender Sensibilisierung: 16/1000 Sek. im Abstand von 90 cm mit dem Blitzgerät 245 STC von Metz. Weiter ist eine $CaWO_4$-Verstärkungsfolie zwischen dem auf Papier aufgezogenen, getrockneten Gel und dem Film nötig. Die Filme wurden in einem Entwicklungsautomaten (von Dupont) 3 min lang entwickelt.

17.7. Chloramin T-Jodierung von Marker-Proteinen

Zur Molekulargewichtsbestimmung der radioaktiven, präzipitierten Proteine wurden in demselben Gel radioaktive Marker-Proteine wie Cytochrom C, Maus-IgG und -IgM und Rinderserumalbumin mit aufgetrennt. Diese Substanzen wurden nach der Chloramin T-Methode von Hunter und Greenwood (115) mit I-125 oder I-131 radioaktiv markiert (siehe II, 16.1.). Nach der

gleichen Methode wurden auch gereinigte Antikörper für die Zyto-Radioautographie jodiert.

18. Die gemischte Lymphozyten-Kultur (MLC = mixed lymphocyte culture)

In der MLC werden Lymphozyten aus zwei ingezüchteten Mäusestämmen mit verschiedenen Histokompatibilitäts-Antigenen miteinander kultiviert.
Die Responder-Zellen, C57bl/6-Lymphozyten, tragen den Haplotyp b ($H\text{-}2^b$). Sie sollen durch Erkennen des inkompatiblen Haplotyps d ($H\text{-}2^d$) auf DBA/2-Zellen, den Stimulatorzellen, zur Proliferation angeregt werden.
Das Ausmaß dieser Alloantigen-Stimulation, die sich morphologisch in der Umwandlung kleiner Lymphozyten in mindestens doppelt so große Blasten ausdrückt, wird durch den Einbau von ^3H-Thymidin gemessen.
Um zu verhindern, daß die Stimulatorzellen ihrerseits auf die Responderzellen reagieren, werden die Stimulatorzellen entweder bestrahlt (mit γ-Strahlen) oder mit Mitomycin C vorinkubiert.

18.1. MLC-Medium

Für die MLC wurde frisch angesetztes Medium folgender Zusammensetzung verwendet:

500 ml DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco Bio-Cult)
+ 200 mM L-Glutaminlösung (Gibco Bio-Cult, Glasgow, Scottland), Endkonzentration = 2 % (v/v)
+ Penicillin/Streptomycin-Lösung (Gibco Bio-Cult), Endkonzentration = 2 %
+ NEAA (Non Essential Amino Acids, Gibco Bio-Cult), Endkonzentration = 1 %

+ 2-Mercaptoäthanol, Endkonzentration = 5×10^{-5} M
(Merck, zur Synthese)
+ fötales Kälberserum (FCS, Gibco Bio-Cult) wurde bei 56°C 50 min hitzeinaktiviert und anschließend 20 min bei 48000 g abzentrifugiert, Endkonzentration = 5 %.

Alle Zusätze wurden steril zugegeben. Das FKS wurde zunächst durch ein Millipore Filter mit 0.8 µ Porenweite filtriert, um größere Partikel zu entfernen. Anschließend wurde es durch ein Millipore-Filter mit 0.22 µ Porenweite steril filtriert.

18.2. Zellen

Die verwendeten Milzzellen aus C57bl- und DBA-Mäusen wurden steril präpariert (siehe II, 13.3.).

18.2.1. Stimulatorzellen (DBA/2)

Die DBA-Stimulatorzellen wurden in Petriperm-Schalen (Heraeus) mit 3000 rd, bei einer Dosisleistung von 700 rd/min, bestrahlt. Als Strahlenquelle diente ein "Stabilipan" von Siemens mit 0.6 mm Al-Filter bei 50 kV und 25 mA.
Alternativ wurde eine Behandlung mit Mitomycin C durchgeführt. Dazu wurden 10 ml Zellsuspension (5×10^6/ml) mit 1 ml Mitomycin-Lösung (von Serva, 0.5 mg/ml in DMEM) 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Mitomycin C durch 2 x waschen (7 min, 150 g) mit DMEM entfernt und auf 5×10^6/ml Zellen in MLC-Medium eingestellt.

18.2.2. Vorinkubation der Responderzellen (C57bl/6) mit Antiserum bzw. daraus isolierten Antikörpern

Zur Inhibition der Alloantigenerkennung sollte der Antigen-Rezeptor auf den C57bl-Zellen mit Anti-IgM-Antikörpern "abgedeckt" werden.
Dazu wurden 1 x 10^6 Zellen mit 50 µl Antiserum in verschiedenen Verdünnungen für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um Komplement-Effekte auszuschalten, wurden alle Seren vor Benutzung bei 56°C für 50 min hitzeinaktiviert und 20 min bei 40000 g abzentrifugiert und anschließend gegen DMEM dialysiert. Der Vorinkubationsansatz wurde mit 1 ml DMEM verdünnt, abzentrifugiert und die Zellen in MLC-Medium aufgenommen (1 x 10^6/ml).

18.2.3. Durchführung der MLC (C57bl → DBA)

In Microtiterplatten (von Nunclon) wurden zu 100 µl MLC-Medium jeweils 50 µl (1.5 x 10^5) Stimulator- und Responderzellen in Triplikaten pipettiert und 68 Stunden bei 37°C im Brutschrank (5 % CO_2-Begasung) inkubiert. Ein Puls von 1 µCi (Methyl-^{3}H)-Thymidin (Amersham Buchler, TRK 120, 18-25 Ci/mmol) pro Loch für 4 Stunden beendete die Kultur.

Mit einer automatischen MLC-Ernte-Maschine (Werkstattmodell) wurde jeweils der Inhalt einer ganzen Reihe von Löchern der Microtiterplatten auf Millipore-Glasfilter (mit 1 % BSA getränkt) gesaugt.
Zur quantitativen Ablösung der Zellen vom Boden der Löcher wurden die Ansätze vorher trypsinisiert, d.h. 1 Tropfen einer 7.5 % Trypsin (Serva)-Lösung mit 20 mM EDTA pro Loch wirkte etwa 5 min bei Raumtemperatur ein.
Nach etwa 20-maligem Nachspülen mit Aqua dest. wurden die Filter in β-Zähler-Röhrchen transferiert und mit 1 ml Soluene (Roth, Karlsruhe) für mindestens 30 min inkubiert. Dann wurden 10 ml Fertig-Szintillator (Roth, Karlsruhe) zugege-

ben und gemischt. Nach Abklingen der Chemoluminiszenz (mind. 4 Std., 4°C) wurden die Filter je 1 min im β-Zähler gezählt.

18.2.4. Testansätze und Kontrollen

Zur Überwachung der Spezifität der MLR und deren Inhibition mit α-IgM-AS wurden folgende Kontrollansätze eingeschlossen:

a) Test auf "Background"-Einbau

- Ansatz mit Stimulatorzellen (bestrahlte DBA/2) ohne Responderzellen
- Ansatz mit Responderzellen (C57bl/6) ohne Stimulatorzellen

b) Test auf Stimulation

- Ansatz mit nicht-vorinkubierten Responderzellen und Stimulatorzellen

c) Test auf unspezifische Inhibition

- Ansatz mit vorinkubierten Responderzellen (Prä-Immunseren, Kontroll-Immunseren) und Stimulatorzellen

d) Test auf spezifische Inhibition

- Ansatz mit vorinkubierten Responderzellen (α-IgM-AS, αμ-AS) und Stimulatorzellen

18.2.5. Auswertung der MLC

Die cpm-Werte der Triplikate wurden gemittelt. Zur besseren Vergleichbarkeit der MLC's (verschiedene Stimulationshöhen) wurden die cpm der einzelnen Seren (Ansatz c, d) in Prozent der cpm der Ansätze ohne Serum-Vorinkubation des Responders (Ansatz b) ausgedrückt. Zur Berechnung der Inhibition durch die Immunseren wurden die gemittelten cpm-Werte der Kontrollseren-Vorinkubationen als 100 % eingesetzt.
Als Stimulationsindex ist der Quotient aus Einbau der Kultur von Responder + Stimulatorzellen durch Einbau der Kultur von Responderzellen alleine definiert.

$$S_I = \frac{\text{cpm (Responder + Stimulator)}}{\text{cpm (Responder)}}$$

19. Komplement-Lyse Antikörper-beladener Lymphozyten (Mikroansatz)

Lymphozyten aus Maus-Lymphknoten wurden mit Hühner Anti-IgM-Antikörpern, die auf ihrer Oberfläche spezifisch gebunden hatten, mit Hilfe von Komplement lysiert.
Verwendet wurde eine Modifikation der von Terasaki et al. (118) angegebenen Mikromethode.
Ziel der Versuche war es, die optimalen Konzentrationen an normalem Hühnerserum (als C1-Quelle) und an Meerschweinchenkomplement (lyophilisiert, von Behring; als Quelle der übrigen Komplement-Komponenten C2-C9) bei verschiedenen Konzentrationen an Hühner-αIgM-AS auszutesten.
Die Verwendung von Hühner C1 ist nötig, da nach Stolfi et. al. (116,117) auf Hühner-Antikörpern die C1-Komponente von Meerschweinchen-Komplement nicht bindet.
Unter diesen optimierten Bedingungen sollte versucht werden, die in der MLC-induzierten zytotoxischen T-Lymphozyten (siehe II, 20.1.) mit Hühner-αIgM p.c. Antiserum bzw. Hüh-

ner-αμ-Antikörpern und Komplement zu lysieren (siehe II, 20.2.3.).
Anschließend wurde die zytotoxische Aktivität der verbliebenen, nicht-lysierbaren Zellen in der CMC (siehe II, 20.2.) gegen Cr^{51} - markierte Zielzellen getestet.

Versuchsansatz:

In Microtiterplatten (Greiner) wurde der V-Boden mit einem Tropfen schwerem Paraffinöl bedeckt.
2 µl der Zellsuspension (2 x 10^6 Lymphknotenzellen in TC-99 Medium (Difco) mit 10 % FKS) wurden mit einer Hamilton-Mikropipette durch das Öl zu den vorgelegten Antiserum-Verdünnungsreihen (je 2 µl) pipettiert. Nach Inkubation 30 min bei Raumtemperatur wurden 2 µl normales Hühnerserum, nach weiteren 15 min die Meerschweinchen-Komplement-Verdünnungen zupipettiert. Zur Entwicklung der Lyse wurde 1 Std. bei 37°C inkubiert. Dann wurden 2 µl Eosinlösung (5 %, in Aqua dest.) zugegeben und nach weiteren 10 min die Löcher mit 8 µl Formaldehydlösung (30 %, von Merck) gefüllt und die Löcher mit einer Glasplatte abgedeckt. Durch die Zugabe des tieforangen Vitalfarbstoffs Eosin (Biorad) wurde im Mikroskop die Differenzierung zwischen vitalen (hellen) und lysierten (dunklen) Zellen möglich. Die Konservierung durch Formaldehyd machte auch spätere Auswertung möglich. Nach dem Auszählen von mindestens 100 Zellen wurde der Prozentsatz der lysierten Zellen berechnet.

20. Der zellvermittelte Zytotoxizitätstest (C M C)

(C M L = Cell Mediated Lysis; C M C = Cell Mediated Cytotoxicity)

1968 beschrieb K.T. Brunner erstmals Methoden, um zytotoxische T-Lymphozyten nachzuweisen (119). Zwei Jahre später fand man, daß die zytotoxischen Zellen statt durch in vivo Immunisierung auch durch eine in vitro MLR (mixed lymphocyte reaction) induziert werden konnten (120,121). Die zytotoxische Aktivität dieser MLR-induzierten Zellen mit T-Zell-Charakter bestimmte man anschließend durch Cr51 -Freisetzung aus den Zielzellen. Die chromierte Zielzelle muß in Bezug auf ihre H-2 Oberflächenantigene syngen zu der Stimulatorzelle in der MLR sein. Zielzellen, die syngen zu der antwortenden MLR-Zelle sind, werden von den zytotoxischen T-Zellen nicht lysiert.

20.1. Die präparative, gemischte Lymphozytenkultur (MLC) zur Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten

Die Milzen der C57bl- und der DBA-Mäuse wurden aseptisch herauspräpariert und mit einem Homogenisator nach Tenbroeck zerkleinert. Zur Entfernung größerer Zellklumpen wurde die Suspension anschließend durch ein feinmaschiges Netz (ca. 70 Maschen/mm^2, Fa. Weisse & Eschrich, Ludwigsstadt) gespült. Die Zellen wurden 2 mal gewaschen (7 min, 150 x g) und auf 2.5 x 10^7 Zellen/ml Medium eingestellt.
2.5 x 10^7 bestrahlte (siehe II, 18.2.1.) DBA-Stimulatorzellen in 10 ml Medium wurden mit 2.5 x 10^7 C57bl-Responderzellen in 10 ml Medium in einer Gewebekulturflasche (Nr. 3013, Falcon) 5-6 Tage mit lose aufgesetztem Deckel bei 37°C im Brutschrank inkubiert, wobei die Zellen mit einem Gemisch aus 8 % CO_2 und 92 % Luft begast wurden.
Als Kontrolle wurden die C57bl-Responderzellen und die DBA-Stimulatorzellen in der gleichen Konzentration getrennt in Kultur genommen.

20.2. Durchführung des zellvermittelten Zytotoxizitätstests

20.2.1. Chromieren der DBA/P815-Zielzellen

Als Zielzellen wurden statt der als Stimulatorzellen verwendeten DBA-Milzzellen die syngenen, besser lysierbaren P815-Mastozytomzellen verwendet (120).
Die in vitro kultivierten P815-Zellen (siehe II, 9.1.3.) wurden geerntet und 1 bis 2 mal gewaschen (7 min, 150 g). Etwa 1 x 10^6 P815-Zielzellen wurden in 1 ml MLR-Medium aufgenommen und je nach Aktivität des radioaktiven Chroms (Halbwertszeit 27,8 Tage) mit 0.2 bis 0.5 ml ^{51}Natriumchromat in physiologischer Kochsalzlösung versetzt (Amersham Buchler, Braunschweig, CJ5.4 mit 5 mCi/6 ml). Unter gelegentlichem Schütteln wurden die Zellen anschließend 2 Std. bei 37°C und 8 % CO_2-Begasung im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die chromierten Zellen 3 mal gewaschen (150 g, 7 min) und auf 1 x 10^5 Zellen/ml MLR-Medium eingestellt. Zur Bestimmung des Cr-51-Einbaus wurden 100 µl dieser Suspension abzentrifugiert (400 g, 7 min, 4°C). 50 µl Überstand (1/2 Üst.) wurde abgehoben, in ein neues Gefäß pipettiert und beide Proben im Gammastrahlen-Szintillationszähler (Autogamma, Searle, Nuclear-Chicago) eine Minute lang gemessen.
Die Zahl der geschädigten Zellen wurde mit dem Trypanblau-Test ermittelt und lag stets unter 10 %.

20.2.2. Vor-Inkubation der zytotoxischen Zellen ohne Komplement

Die MLR-induzierten, zytotoxischen Zellen wurden zweimal gewaschen. Alle Inkubationen wurden in 1.5 ml-Reaktionsgefässen (Greiner, Nr. 618201, Nürtingen) durchgeführt. Jede Probe hatte ein Gesamtvolumen von 0.2 ml. Jeweils 2 bis 8 x 10^5 zytotoxische Zellen (20 µl) wurden mit 20 µl des zu testen-

den AS oder gereinigten AK (2 mg/ml in Medium) 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Verdünnung auf 200 µl mit MLC-Medium wurden die Ansätze geteilt und so Duplikate hergestellt. Nach Zugabe von 1 x 10^4 radioaktiv markierten Zielzellen in 100 µl zu jeder Probe wurden die Proben 4 Std. bei 37°C im Brutschrank inkubiert (mit 8 % CO_2 Begasung). Danach wurden die Proben abzentrifugiert (7 min, 400 g) und 100 µl Überstand, d.h. die Hälfte des Gesamtvolumens von 200 µl in ein anderes Reaktionsgefäß pipettiert.
Im γ-Szintillationszähler wurden jeweils beide Proben, d.h. 1/2 Überstand und 1/2 Überstand mit Zellsediment, ausgezählt. Die Auswertung des zellvermittelten Zytotoxizitätstests erfolgte wie unter II, 20.2.4. beschrieben.

20.2.3. Vor-Inkubation der zytotoxischen Zellen mit Komplement

Die Komplement-Lyse von Lymphozyten mit Hühnerantiseren funktioniert nicht bei Verwendung von Meerschweinchenkomplement, da der initiale Schritt der Komplement-Aktivierung, die Bindung von C1 an den Hühner-AK, nicht möglich ist (116, 117). Wird jedoch frisches Hühnerserum als C1-Spender zugesetzt, kann die hocheffiziente Kaskade der Aktivierung des Meerschweinchen-Komplementsystems (C2-C9) zur Lyse führen. Hühnerserum alleine lysiert AK-bindende Zellen nur zu einem geringen Teil.
1.5 x 10^6 zytotoxische Zellen wurden in 20 µl RPMI-Gewebekulturmedium (RPMI 1640, Gibco, Bio-Cult, Karlsruhe) mit 20 µl Antikörperlösung (2 mg/ml in PBS) für 30 min bei Raumtemperatur (R.T.) inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl frischem Normalem Hühnerserum (auf 1:25 verdünnt) als Spender der C1-Komplement-Komponente wurde weitere 30 min bei R.T. inkubiert. Eine 60-minütige Inkubation bei 37°C nach Zufügen von 10 µl Meerschweinchenkomplement (lyophilisiert, Behring, 1:5 verdünnt) als Quelle der Komplement-Komponenten C2 bis C9 diente zur Lyse der αµ-Antikörper-bindenden Zellen.

Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Medium gewaschen, in 200 µl Medium aufgenommen und in 2 Portionen à 100 µl aufgeteilt, zu denen dann je 1 x 10^4 51-Cr-P815-Zielzellen in 100 µl RPMI-Medium zupipettiert wurden. Im weiteren Verlauf wurde die CMC wie unter II, 20.2.2. beschrieben durchgeführt. Die verwendeten Hühner- und Meerschweinchen-Komplement-Verdünnungen wurden in einem Mikro-Zytotoxizitätstest (siehe II, 19.) ausgetestet.

20.2.4. Auswertung des Versuchs

Zunächst wurden die Werte für die Cr51-Freisetzung der Maximal- (M), der Spontan- (S) und der experimentellen Werte (E) nach folgender Formel (1) ermittelt:

$$(1) \quad {}^{51}\text{Cr-Freisetzung} = 100\ \% \times \frac{\text{cpm 3 x (1/2 Überstand)}}{\text{cpm (1/2 Üst.) + (1/2 Üst. + Zellen)}}$$

E = Experimentelle Cr51-Freisetzung bei Inkubation MLR-induzierter Responderzellen mit chromierten Zielzellen

S = Spontane Cr51-Freisetzung bei Inkubation von chromierten Zielzellen alleine

M = Maximale Cr51-Freisetzung bei dreimaligem Einfrieren (-20°C)/Auftauen (37°C) chromierter Zielzellen

Deren jeweiliger Mittelwert wurde dann in Formel (2) eingesetzt:

$$(2) \quad \text{Spezifische Cr51-Freisetzung} = \frac{E - S}{M - S} \times 100 \quad (\%)$$

Die Berechnung der spezifischen Cr51-Freisetzung ermöglicht den Vergleich der Zytotoxizität in Experimenten mit verschiedenem spontanem und experimentellem Release.

III. E R G E B N I S S E

1. Präparation von Maus-IgM aus Normalem Maus Serum (NMS)

1.1. Reinigung von Maus-IgM aus dem Aszites von IgM104E-Myelom-Mäusen

Als Ausgangsmaterial dienten 49 ml Maus-Aszites (Bionetics). Der Gehalt an IgM104E wurde mit 1 mg/ml angegeben bei einem Gesamt-Proteingehalt von 13 mg/ml.
Nach Auftrennung in der Pevikon-Blockelektrophorese zeigte sich der IgG-Anteil stark verringert bei Analyse in der Immunelektrophorese (IE). Auch die Albuminkontamination war immunelektrophoretisch deutlich reduziert. Die noch immer relativ starke Albumin-Linie in der IE (Abb. 5) erklärt sich durch die bevorzugte Reaktion des KαNMS-Antiserums gegen Albumin. Insgesamt 69 mg der rohen IgM-Fraktionen wurden vereinigt und auf einer Sepharose 6B-Säule aufgetrennt. Die erhaltenen 15 mg IgM zeigten bei einer Auftragskonzentration von 15 mg/ml immunelektrophoretisch keine Kontamination. Wurden jedoch IgM104E in einer Konzentration von 25 mg/ml aufgetrennt, zeigte sich noch eine geringe Albuminbeimengung (siehe Abb. 5).
In a, b und c ist die IgM-Präzipitationslinie nur schwach zu erkennen, da die IgM-Konzentration noch gering ist und das Antiserum gegen NMS nur schwach gegen das im Serum nur zu ∿ 0.7 % enthaltene IgM reagiert. Sie liegt (siehe d) etwa auf Höhe des Auftragslochs im Gegensatz zur IgG-Linie, die weit kathodisch reicht.
Als weiteres Reinheitskriterium wurde die SDS-Disc-PAGE unter reduzierenden Bedingungen für die verschiedenen Präparationsschritte des IgM herangezogen (Abb. 6).
Die Gele 1 und 2 enthalten verschiedene Proteinmengen. Das gereinigte IgM weist (Abb. 6, Gel 2, Bahn c) bis auf die Albuminverunreinigung keine weiteren Kontaminationen auf, doch bei doppelter Proteinkonzentration (Gel 1) zeigten sich noch

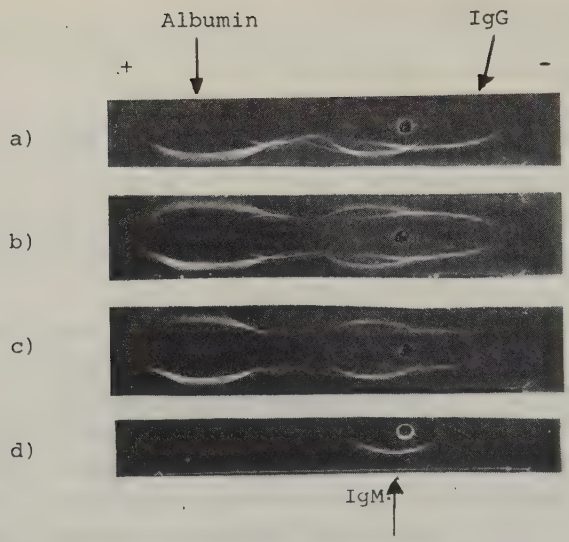


Abb. 5: Analyse der Reinheit des IgM104E nach verschiedenen Isolierungsschritten in der Immunelektrophorese (IE).

Auftrag:
a) NMS
b) Aszites
c) IgM-Fraktionen der Pevikon-Blockelektrophorese
d) gereinigtes IgM nach Pevikon und Sepharose 6B
Die Entwicklung der IE erfolgte mit Kaninchen-Antiserum gegen Normales Maus-Serum (NMS).

Spuren von γ-Ketten. Sowohl bei Einengungen als auch bei anderen Manipulationen wie Pufferwechsel, besonders aber beim Auftauen eingefrorener Proben traten immer wieder Präzipitate auf. Ihre Analyse in der SDS-Disc-PAGE zeigte, daß sie überwiegend aus IgM bestanden. Zur Vermeidung größerer Verluste wurden deshalb IgM-Lösungen sterilfiltriert und bei $4^{o}C$ aufbewahrt.

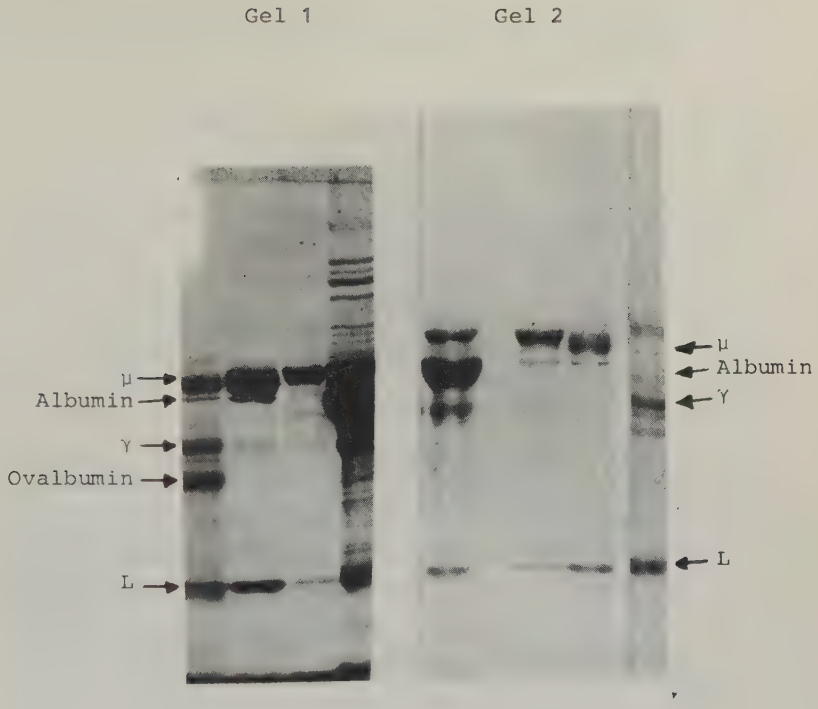


Abb. 6: Analyse der IgM-Präparationen isoliert aus Aszites von IgM104E-Myelom-Mäusen mit Hilfe der SDS-Disc-PAGE (5-15 % linearer Gradient, reduzierende Bedingungen)

	Proteinmenge in µg Gel 1	Gel 2
a) IgM104E-Myelom Aszites	60	40
b) IgM-Fraktionen nach Pevicon-Elektrophorese	20	20
c) IgM-Fraktionen nach Pevicon und Sepharose 6B	30	15
d) Marker: Maus IgM, IgG (zusätzlich in Gel 1: Ovalbumin)	je 10 µg	

1.2. Herstellung von Kaninchen-Antiseren gegen IgM104E und Präparation von μ-Ketten spezifischer "Antikörper"

Die vier mit IgM104E immunisierten Kaninchen zeigten in der Passiven Hämagglutination Titer zwischen 2^{-14} und 2^{-17}. Sie reagierten in der ID außer mit IgM auch mit IgG. Deshalb wurden dieAnti-IgM-Antikörper zur Entfernung der αL-Ketten Aktivitäten auf einer Sepharose-Säule mit insolubilisiertem Maus-IgM absorbiert. Auch Spuren von αIgG-Antikörpern, die u.U. bei der Immunisation mit den geringen IgG-Verunreinigungen der IgM104E-Präparationen induziert worden waren, wurden auf diese Weise entfernt. Antikörper mit Spezifität gegen Albumin und andere Serumproteine wurden durch Passage über eine sog. "Maus-Ig-Loch-Säule" absorbiert. Diese bestand aus Sepharose 6B, an die alle außerhalb des γ-Globulin-Bereichs wandernden Serumproteine gekuppelt waren.
Am schonendsten und effektivsten ließen sich die auf der IgM-Säule gebundenen, μ-spezifischen Antikörper mit 5 M Magnesiumchlorid eluieren.
Ihre Analyse in der ID (Abb. 7) zeigte ihre Spezifität für μ-Ketten.

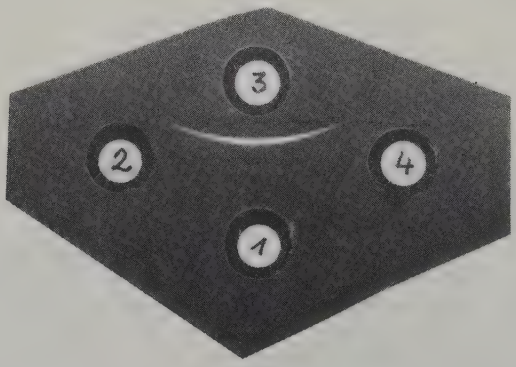


Abb. 7: ID-Test der μ-Spezifität der gereinigten Antikörper aus Kaninchen Anti IgM104E Antiserum.
1: Kaninchen αμ-AK
2: Maus IgG
3: Maus IgM
4: Maus Albumin
Die gekrümmte Linie ist auf die geringere Diffusionsgeschwindigkeit des pentameren IgM gegenüber dem monomeren IgG-Antikörper zurückzuführen.

90 mg dieses gereinigten AK wurden an CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekuppelt und zur Isolierung von IgM aus normalem Maus-Serum verwendet.

1.3. Isolierung von Maus IgM aus normalem Maus Serum

1.3.1. Reinigung mittels Affinitätschromatographie

Die Ein-Schritt-Reinigung mit der Kaninchen Anti-μ Säule (siehe II, 2.) war nicht möglich, da trotz nachgewiesener αμ-Spezifität des gekuppelten AK neben IgM in geringen Mengen auch IgG und Albumin eluiert wurden. Aus diesem Grund wurde versucht, das NMS mit "Blue Sepharose" von Albumin und mit "Protein A" (isoliert aus Staphylococcus aureus) von IgG zu befreien.

a) "Blue Sepharose CL 6B"-Absorption
Die von Travis (79) angegebene Bindungskapazität von 5 mg Human-Albumin pro ml gequollenes Gel konnte für Mausalbumin nicht bestätigt werden.
Bei Auftrag von 7 ml NMS auf eine 100 ml Blue-Sepharose-Säule mit einer angegebenen Bindungskapazität von 500 mg humanem Albumin wurde von den geschätzten 210 mg Maus-Albumin des Serums nur 35 mg gebunden.

b) Protein A-Absorption
Durch die Passage von NMS über eine Protein A-Säule konnte IgG aus NMS zu einem großen Teil entfernt werden (siehe Abb. 8). Jedoch auch bei wiederholter Absorption des Serums über die Protein A-Säule konnte der IgG-Rest nicht völlig entfernt werden (vgl. Abb. 8, Bahn a und c), da offensichtlich auch die IgG-Subklassen der Maus verschieden starke Affinität für Protein A besitzen. So wird IgG1 der Maus nicht von Protein A gebunden (114).

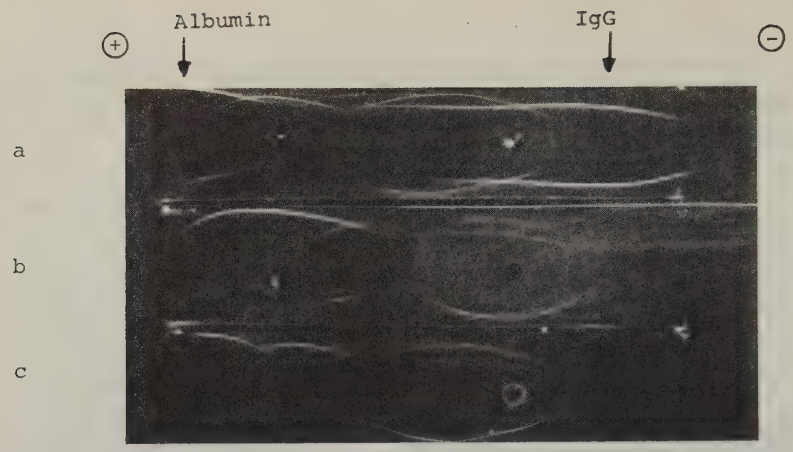


Abb. 8: Immunelektrophoretische Analyse des IgG-depletierten NMS

a) NMS
b) 2 x an Protein A-Säule absorbiert
c) 3 x Protein A absorbiert
Die in der IE aufgetrennten Serumproteine wurden mit KαNMS-Antiserum präzipitiert.

c) Kaninchen Anti-μ-Säule

Über Blue Sepharose- und Protein A-Säulen vorgereinigtes NMS wurde über eine Kaninchen Anti-μ-Säule passiert. Da mit 0.5 M Essigsäure und 0.5 M Ammoniumhydroxyd immer noch kontaminiertes IgM von dieser Säule eluiert wurde, mußte versucht werden, unspezifisch adsorbiertes Albumin und andere Kontaminationen auszuwaschen, ohne das mit höherer Affinität spezifisch gebundene IgM zu eluieren. Für diese abgestufte Elution wurden folgende Puffer verwendet:

1 M NaCl pH 7.4 (in 0.1 M Phosphatpuffer)
2 M NaCl pH 7.4 (")
1 M NaCl pH 9.5 (")
2 M NaCl pH 9.5 (")
0.1 M Glycinpuffer pH 2.5
0.1 M Glycinpuffer pH 4.0

0.1 M KSCN pH 7.4 (in 0.1 M Phosphatpuffer)
0.5 M KSCN pH 7.4 (")
1.0 M KSCN pH 7.4 (")

Für die Auswaschung kontaminierender Proteine erwies sich 2 M NaCl in 0.1 M Glycin-NaOH-Puffer pH 9.5 als optimal. Die anschließende Elution des spezifisch gebundenen IgM erfolgte mit 0.5 M Essigsäure/0.5 M Ammoniumhydroxyd (siehe Abb. 9).
Die Verunreinigungen dieses IgM ließen sich durch die Verwendung von Albumin- und IgG-depletiertem NMS nicht wesentlich reduzieren.
Für die quantitative Bestimmung wurden die gefärbten Polyacrylamidgele der IgM-Präparationen auf Cellophanfolien aufgezogen und densitometrisch analysiert.
Dabei ergab sich folgendes Ergebnis:

IgM	: 85 %	(mit Vorelution)	65 %	(ohne Vorelution)
Albumin:	1 %	(")	8 %	(")
IgA	: 9 %	(")	17 %	(")
IgG	: 5 %	(")	10 %	(")

bei angenommener gleicher spezifischer Färbbarkeit mit Coomassie Brilliant Blue.

d) Säulenchromatographie an Sephadex G 150

Der Versuch, den stark verunreinigten Teil der IgM p.c.-Eluate von der Kαμ-Säule durch Säulenchromatographie mit Sephadex G 150 superfine weiterzureinigen, brachte keine weitere Reduktion der Verunreinigungen (siehe Abb. 10). Sowohl in Bahn e Abb. 9 als auch in den Bahnen a-c, Abb. 10, zeigte sich in den Eluaten der αμ-Säule neben der μ-Kette ein sehr geringer Anteil an γ-Kette und eine Bande bei etwa 55-60 000 d, die in der Peak-Fraktion der G150-Säule (Bahn b, Abb. 10) in vergleichbarer Menge zusammen mit μ auftrat. Abb. 9, Bahn e, zeigt, daß diese Bande durch 2 M NaCl, pH 9.5, selektiv eluierbar ist. Sie tritt zusammen mit leichten Ketten auf. Das gleiche 55-60 000 d-Molekül tritt bei der Pevicon-Elektrophorese von Makromolekülen aus NMS (Ausschlußvolumen von AcA34: Mg 400000 d)

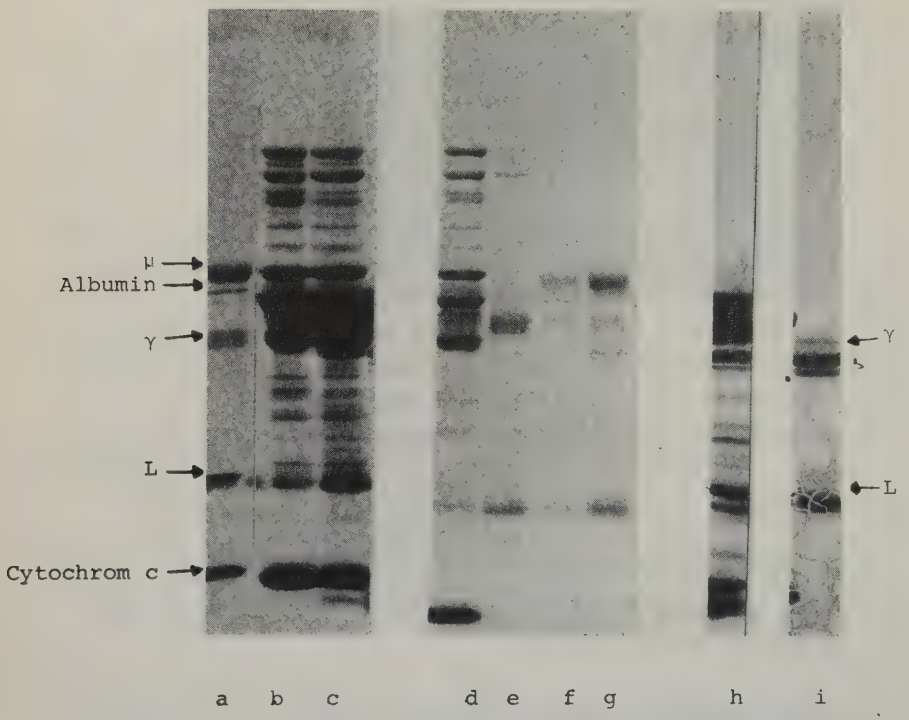


Abb. 9: Analyse der IgM p.c.-Präparation in der SDS-Disc-PAGE (5-15 % Gel mit linearem Gradienten, reduziert)

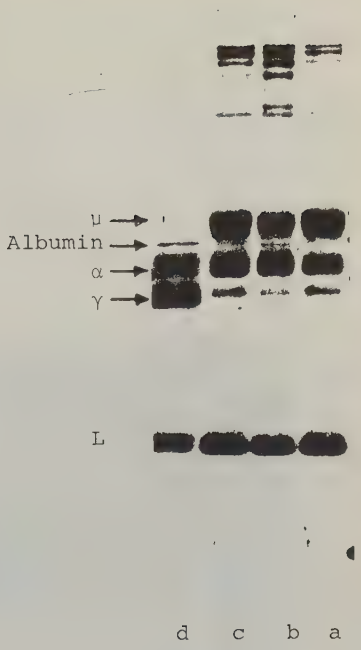
a: Marker: IgM + IgG
b: NMS nach Absorption mit "Blue Sepharose" und Protein A
c: NMS
d: NMS nach Absorption mit "Blue Sepharose" (zweimal) und Protein A

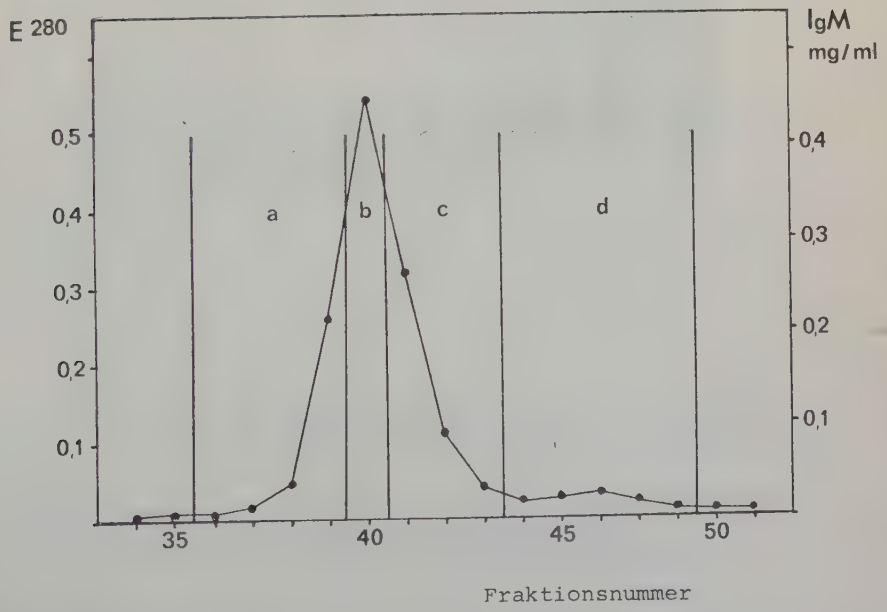
Eluat der Kαμ-Säule:
e: mit 2 M Natriumchlorid, pH 9.5
f: mit 0.5 M Essigsäure
g: mit 0.5 M Ammoniumhydroxyd

h: Eluat der "Blue Sepharose"-Säule (mit 6 M Guanidin)
i: Eluat der Protein A-Säule (mit 6 M Guanidin)

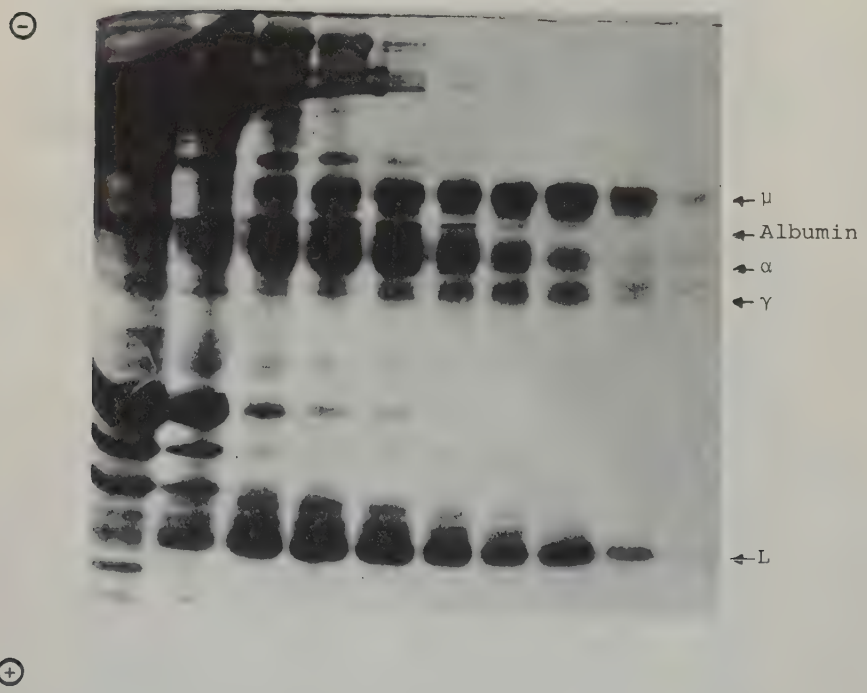
Abb. 10:

Analyse der Sephadex G150-gereinigten IgM-Präparation (Pool von Kαμ-Säule eluiertem IgM p.c.) mit SDS-Disc-PAGE (10 % Gel, reduziert)





zusammen mit μ-Ketten auf (Abb. 11). Es scheint in der Peviconelektrophorese etwas schneller anodisch zu wandern als IgM (Abb. 11). Auch hier korreliert die Menge an L-Ketten mit den 55-60 000 d-Ketten.



Fraktionen des Peviconblocks (total 24, Auftragstelle des vorgereinigten NMS: Fraktion 7)

Abb. 11: Analyse der Pevicon-Fraktionen von AcA34-vorgereinigtem normalem Maus-Serum mittels SDS-Disc-PAGE (10 % Gel, reduziert)

Daraus kann indirekt geschlossen werden, daß neben IgM und geringsten Mengen IgG ein weiteres Molekül an der Kαμ-Säule bindet, das in reduziertem Zustand aus 55-60 000 d-Ketten und L-Ketten aufgebaut ist. Es tritt in vergleichbarer Menge mit IgM auf und ist wie ein Immunglobulin aus H- und L-Ketten aufgebaut. Aufgrund dieser Befunde ist es sehr wahrscheinlich, daß es sich bei H-Ketten dieser Größe um die α-Ketten des IgA handelt.

1.3.2. Reinigung von IgM mittels "klassischer" Methoden

Die Reinigung von IgM mit den zur Verfügung stehenden Kαμ-Affinitätssäulen für die benötigten größeren Mengen (ca. 50 mg zur Präparation von μ-Ketten) erwies sich als sehr zeitaufwendig. Deshalb wurde mit der größeren Durchsatz erlaubenden "klassischen" Blockelektrophorese und Säulenchromatographie IgM aus Serum angereichert. Beide möglichen Kombinationen von Pevicon und AcA34 erbrachten vergleichbare Ergebnisse. IgM-Fraktionen aus 12 Säulenläufen mit je 11 ml NMS wurden in zwei Peviconblöcken weiter aufgetrennt. Die andere Kombination, 20 ml Serum erst im Pevicon und dann im AcA34-Gel aufgetrennt, wurde einmal durchgeführt.
Die Ausbeute an IgM-Fraktionen mit mindestens 50 % IgM-Anteil lag bei etwa 55 mg aus etwa 100 ml NMS. Nur die reinsten Fraktionen (ca. 2 mg IgM insgesamt) waren (Abb. 11, Fraktionen 9 und 10) mit den affinitätschromatographisch gereinigten Präparationen (siehe Abb. 9, Bahn f, g) vergleichbar.

2. Herstellung von Antiseren und gereinigten Antikörpern gegen polyklonales Maus IgM in Kaninchen und Hühnern

2.1. Charakterisierung der Antikörper

Antiseren, die in Kaninchen und Hühnern gegen IgM p.c. induziert wurden, besaßen eine deutliche agglutinierende Reaktivität gegen IgM (Titer in der passiven Hämagglutination: 2^{-14} bis 2^{-17}).
In der ID zeigten die Kaninchen-Antiseren (Abb. 12a) starke Präzipitationslinien, während die Hühner nur eine geringe Reaktivität zeigten (siehe Abb. 12b).

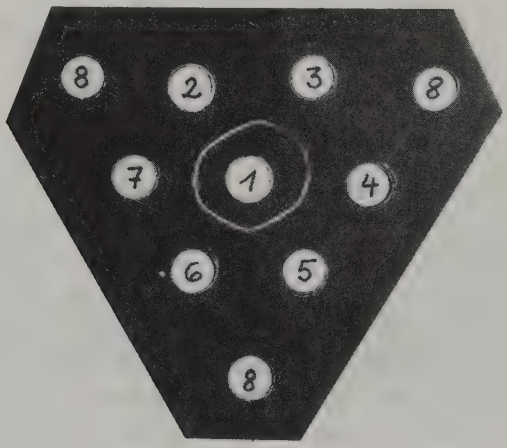


Abb. 12: ID-Test der Anti-IgM p.c.-Antiseren in verschiedenen Spezies.

a) Kaninchen-Anti-Maus-IgM p.c.-Antiseren

1 MIgM p.c.
2 Kaninchen Anti-μ (abs. mit MIgG)
3 Kaninchen A nach 6 Injektionen IgM p.c.
4 " B " 3 "
5 " B " 6 "
6 " C " 6 "
7 " D " 6 "
8 MIgG (Cohn II-Fraktion)

Wie aus Abb. 12b ersichtlich ist, erkennen die Hühnerseren neben IgM auch noch andere Ig-Klassen.

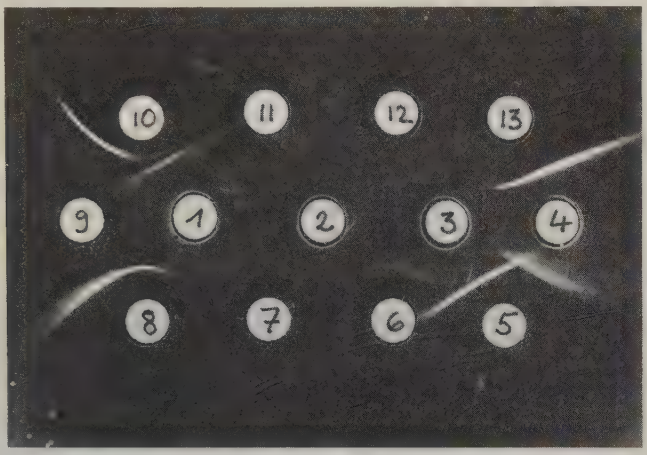


Abb. 12b: Hühner-Anti-Maus-IgM p.c.-Antiseren

1	Huhn αIgM p.c. (3 x injiziert)	a
2	"	b
3	"	c
4	Kaninchen α IgG	
5,10	Normales Maus Serum	
6,7,8	Maus IgM p.c.	
9	Kaninchen α IgM	
11,12,13	Maus IgG (Cohn II Fraktion)	

2.2. Isolierung der γ-Globulin-Fraktionen der Kaninchen- und Hühner-Antiseren gegen Maus IgM p.c. durch Fällung mit Neutralsalzen

Die mit Na_2SO_4 präzipitierten Ig-Fraktionen der Hühneranti-seren zeigen bei unverändertem Präzipitationsmuster in der Immunodiffusion eine Reduktion der Anzahl der Banden in der SDS-Disc-PAGE (Abb. 13).
Durch die $(NH_4)_2SO_4$-Fällung der Kaninchen-Antiseren wurde

die IgG-Fraktion bei zweimaliger Präzipitation um den Faktor 10 angereichert. Die Analyse in der SDS-Disc-PAGE ergab eine starke Reduktion des Albuminanteils im Präzipitat.

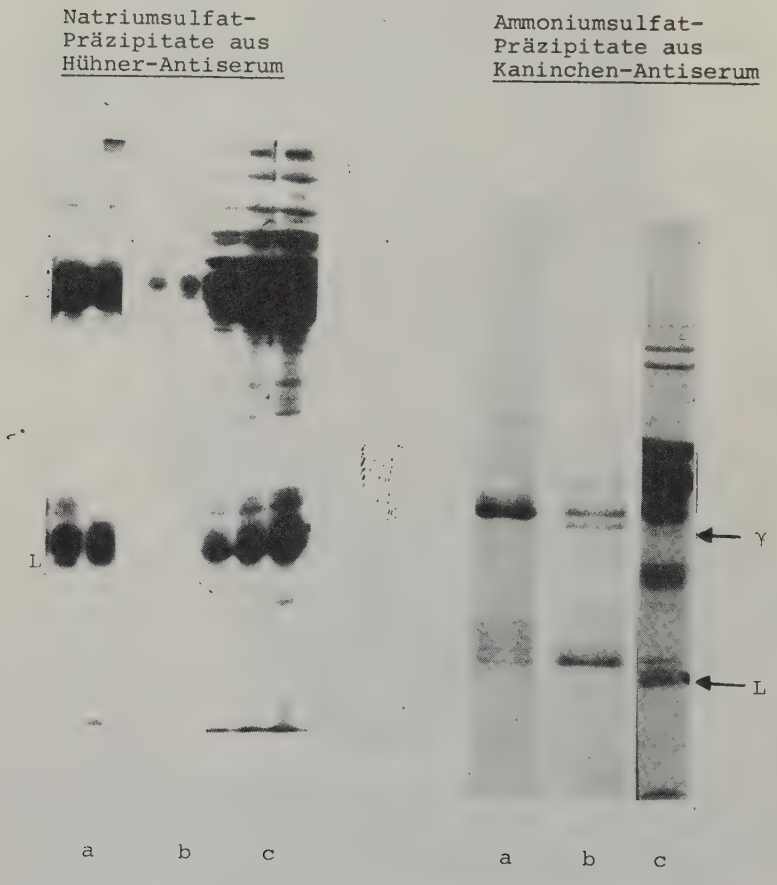


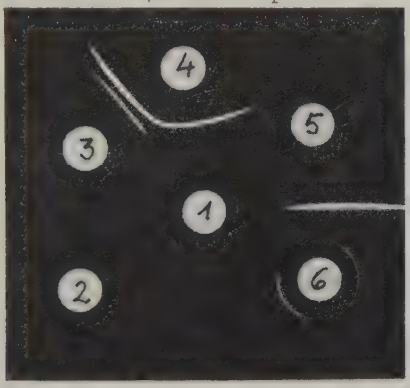
Abb. 13: Analyse der Natrium- bzw. Ammonium-Sulfat-Präzipitate aus Hühner- bzw. Kaninchen-Anti IgM-Antiseren

a: Präzipitate
b: Hühner IgY bzw. Kaninchen IgG
c: Immunseren

2.3. Affinitätschromatographische Reinigung von Anti-μ-Antikörpern aus Kaninchen- und Hühner-Anti IgM p.c.-Antiseren

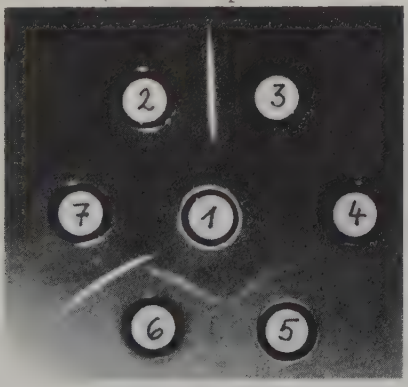
Die Antikörper wurden aus αIgM p.c.-Antiserum isoliert. Eine μ-Kettenspezifität wurde durch Absorption an insolubilisiertem Maus-Albumin und Maus-IgG erzielt. Nach Elution von einer Maus-IgM p.c.-Säule (2-3 mg AK aus 4.5 ml Antiserum) zeigten diese gereinigten Antikörper in der ID folgendes Präzipitationsverhalten (siehe Abb. 14).

a) Kaninchen αμ-Antikörper



1 Kaninchen αμ-AK
2 Albumin
3 Kaninchen αIgM-AS
4 Maus IgM p.c.
5 Maus IgG
6 Kaninchen αIgG-AS

b) Hühner αμ-Antikörper



1 Hühner αμ-AK
2 Kaninchen αIgG-AS
3 M IgG
4 M-Albumin
5 M IgM p.c.
6 Normales Maus Serum
7 Kaninchen αIgM-AS

Abb. 14: ID-Test der gereinigten Kaninchen αμ-AK und Hühner αμ-AK

3. Herstellung von Hühner-Antiseren gegen isolierte µ-Ketten und Fdµ-Fragmente

3.1. Präparation der µ-Ketten aus polyklonalem Maus IgM

Schwere Ketten von Maus IgM p.c. wurden mit Hilfe der präparativen SDS-Disc-PAGE isoliert. Die nach Reduktion in 10 %-Acrylamidgelen isolierte µ-Ketten-Bande wurde ausgeschnitten und durch elektrophoretische Elution an Hydroxylapatit adsorbiert und danach bei hoher Ionenstärke eluiert (Einzelheiten siehe II, 10.1.2.). Aus einem Elektrophorese-Lauf wurde von 3 mg eingesetztem IgM p.c. etwa 1 mg reine µ-Kette gewonnen. Um bei der Immunisierung eine eventuelle Maskierung von Antigendeterminanten durch SDS-Mizellen zu vermeiden, wurde SDS mittels Dowex aus den Fraktionen entfernt.
Die Reinheit der isolierten µ-Ketten wurde durch Reelektrophorese nachgewiesen (siehe Abb. 15).
Ein aliquoter Teil der µ-Ketten wurde zur Entfernung von Zuckerresten mit Perjodat oxidiert (siehe III, 3.2.4.). Die dargestellten Fragmente der µ-Ketten wurden, wie weiter unten ausgeführt, durch standardisierte Verdauung mit Papain gewonnen.

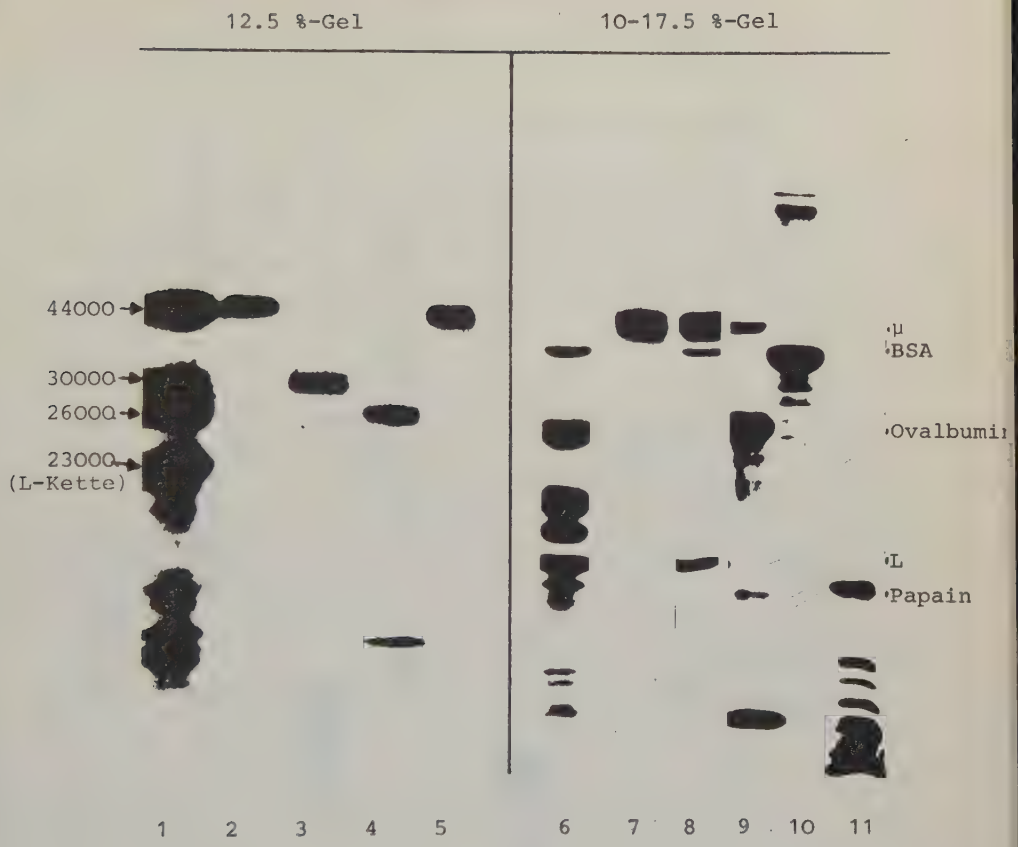


Abb. 15: SDS-Disc-PAGE der gereinigten µ-Ketten und µ-Ketten-Fragmente

1 Papain-Verdauungsgemisch von IgM104E (60 Min)
2 isoliertes 44000 d-Fragment
3 isoliertes 30000 d-Fragment
4 isoliertes 26000 d-Fragment
5 isoliertes 44000 d-Fragment
6 Papainverdauungsgemisch von IgM104E (60 Min)
7 gereinigte µ-Kette

Marker:
8 IgM104E
9 Ovalbumin (Ov.), Cytochrom C
10 BSA
11 Papain, Myoglobin

3.2. Präparation der Fdμ-Fragmente aus dem Papain-Verdauungsgemisch von Maus IgM104E

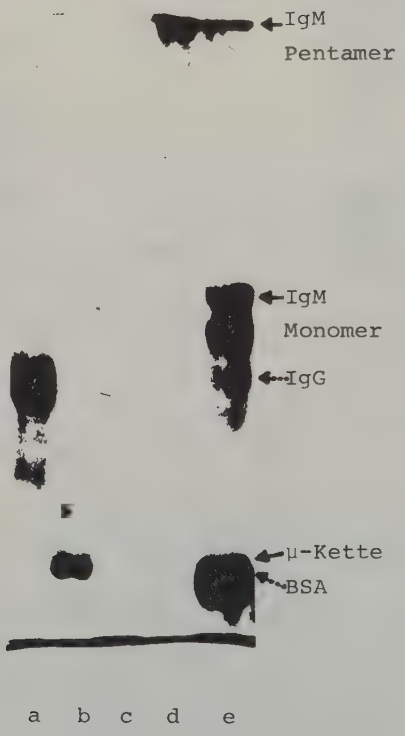
3.2.1. Partielle Reduktion von IgM104E

IgM104E wurde mit 0.54 mM Dithioerythrit (siehe II, 10.3.1.) partiell reduziert, um möglichst viel IgM in monomere Form (85) als Ausgangsmaterial für die Papainverdauung anzureichern. Dabei zeigte sich folgendes Bandenmuster (siehe Abb. 16).

Abb. 16:

Analyse der Produkte der partiellen Reduktion von IgM104E mittels SDS-Disc-PAGE (5 % Gel, nicht reduziert)

a Maus IgG
b BSA
c Ovalbumin
d Maus IgM104%
e partiell reduziertes Maus IgM104E



Der größte Teil des pentameren IgM104E (MG etwa 10^6 d) wurde dabei durch Spaltung der -S-S-Brücken in drei Haupt-Bruch-

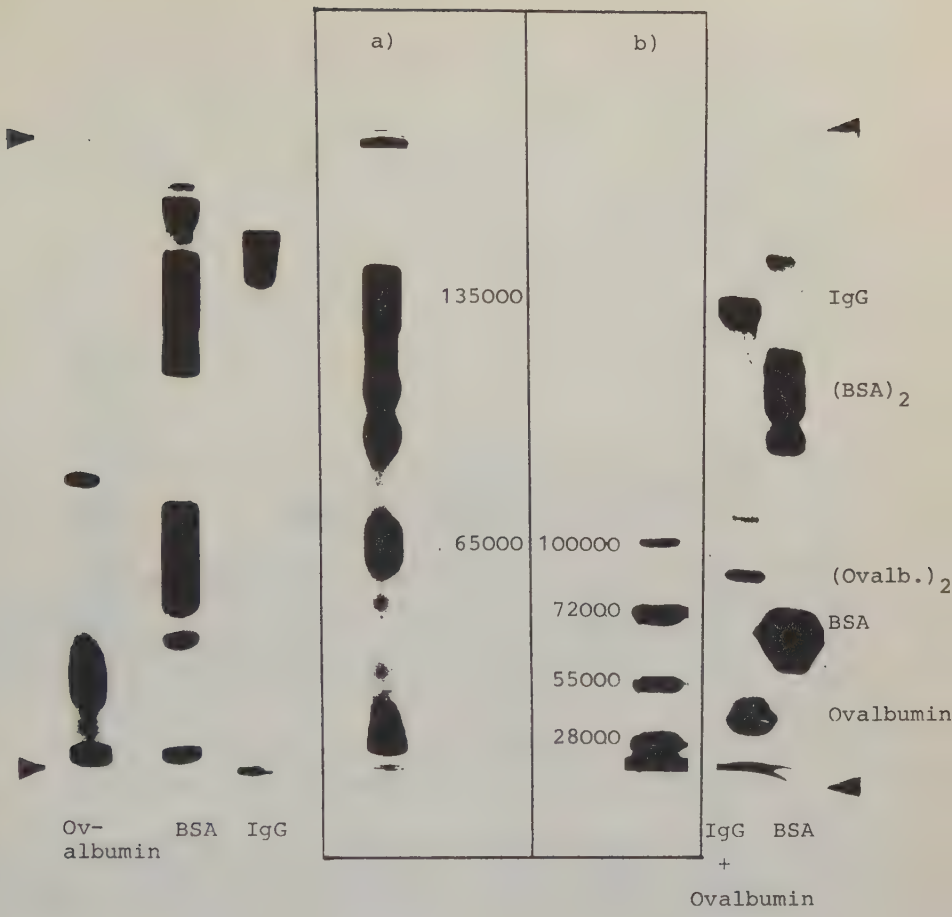


Abb. 17: Analyse der Papain-Verdauungsprodukte von IgM zu verschiedenen Zeiten mittels SDS-Disc-PAGE (5 % Gele, ohne Reduktion)

a) Auftrennung des Verdauungsgemisches nach 15 min in zylindrischen Gelen
b) Analytische Auftrennung nach 120 min im Flachgel

stücke im Bereich von 200 000 d, 175 000 d und 70 000 d dissoziiert. Daneben zeigte sich noch eine geringe Menge an Protein, die nicht in das 5 % Gel eindrang (wahrscheinlich pentameres IgM), weiteres Protein, das mit der Pufferfront wanderte (wahrscheinlich leichte Ketten). Die 200 000 d-Bande stellt monomeres IgM (H_2L_2) dar, während die 175 000 d-Bande vermutlich aus einem IgM-Molekül mit einer abdissoziierten L-Kette (H_2L) besteht. Die 70 000 d-Bande entspricht monomeren µ-Ketten.

3.2.2. Papain-Verdauung von partiell reduziertem IgM104E und Analyse der Verdauungsprodukte

Durch die in II, 10.3.2. beschriebene Papainspaltung des IgM wurden folgende Fragmente erhalten:
Zu Beginn der Spaltung (bis ca. 15 min) entstanden vorwiegend ein etwa 135 000 d und ein ca. 65 000 d großes Bruchstück (siehe Abb. 17).
Nach Fortsetzung der Papainverdauung bis etwa 120 min ließen sich die 135 000 d- und 65 000 d-Fragmente nicht mehr nachweisen.
An ihrer Stelle fanden sich Bruchstücke mit den Molekulargewichten von 100 000 d, 72 000 d, 55 000 d und 28 000 d (siehe Abb. 17).
Das 15-Minuten Verdauungsgemisch wurde in zylindrischen Gelen aufgetrennt. Nach dem Fraktionieren der Gele wurden die IgM-Fragmente mit 135 000 d und 65 000 d aus dem Gel eluiert und unter reduzierenden Bedingungen nochmals elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abb. 18).
Unter reduzierenden Bedingungen spaltete sich das 135 000 d-Fragment vorwiegend in das 44 000 d-Fragment und in ein Molekül von 23 000 d auf.
Nach Befunden von Reth et al. (160) ist im IgM-Molekül die Region zwischen C2µ und C3µ für die proteolytische Aktivität besonders sensibel. In diesem Sinn ist das 135 000 d große

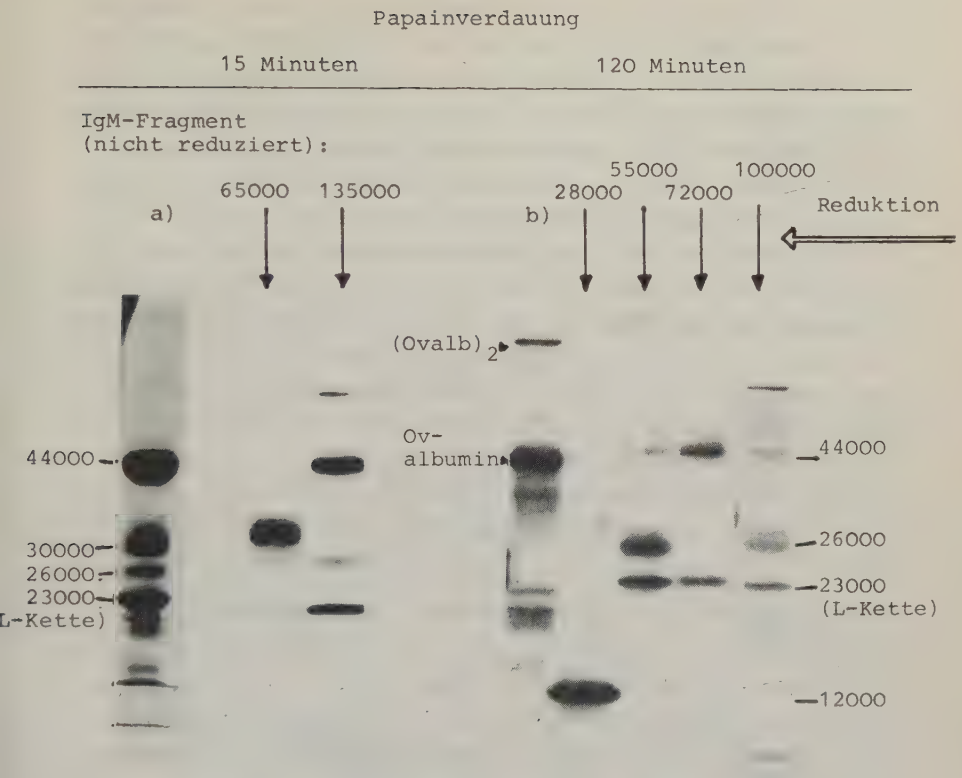


Abb. 18: Reduktionsprodukte der isolierten IgM-Fragmente nach Papainverdauung (SDS-Disc-PAGE in 12.5 %-Gelen, reduziert)

a) Komplettes IgM-Verdauungsgemisch
b) Marker: Ovalbumin

Fragment als $F(ab')_2$ anzusprechen, das, wie in Abb. 18 dokumentiert, unter reduzierenden Bedingungen in das 44 000 d große Fd-Fragment der μ-Kette und in die 23 000 d große leichte Kette des IgM aufspaltet. Dieses Fd-Fragment setzt sich aus den drei aminoterminalen Domänen der aus fünf Domänen aufgebauten μ-Kette zusammen.
Das 65 000 d-Fragment läßt sich unter reduzierenden Bedin-

gungen in ein 30 000 d-Protein ohne leichte Ketten spalten. Da L-Ketten bei dieser Spaltung nicht auftraten, handelt es sich um den Fc-Teil des IgM, der im nativen Zustand aus den beiden COOH-terminalen Domänen (C3μ und C4μ) der μ-Kette besteht, die über eine Disulfid-Brücke gekoppelt sind (87). Diese Domänen enthalten überdies einen großen Teil der Kohlenhydrat-Gruppen des IgM-Moleküls.
In der Anfangsphase (15 min) der Verdauung spaltet Papain hauptsächlich zwischen der C2μ und C3μ Domäne. Nach etwa zweistündiger Verdauung haben sich folgende Bruchstücke gebildet: 100 000 d, 72 000 d, 55 000 d und 28 000 d (siehe Abb. 17). Sie lassen sich unter reduzierenden Bedingungen wie folgt aufspalten (siehe Abb. 18 und Abb. 23).

$$100\,000 \rightarrow (26\,000 + L)_2$$
$$72\,000 \rightarrow 44\,000 + L$$
$$55\,000 \rightarrow 26\,000 + L$$
$$28\,000 \rightarrow 13\,000\ (+ L)$$

Die Hauptbande mit 72 000 d verdient besondere Aufmerksamkeit, da sie sich in ein 44 000 d und ein im L-Kettenbereich wanderndes Protein aufspaltet. Somit dürfte hier das univalente Fab-Fragment vorliegen, welches durch Spaltung der -S-S-Brücke in der C2μ-Region des 135 000 d großen divalenten $F(ab')_2$-Fragments entsteht. Das 23 000 d-Protein wurde immunchemisch als L-Kette nachgewiesen (siehe weiter unten). Die Reduktion im weiteren Verlauf der Verdauung ist mit einem Disulfid-Austausch der -S-S-Brücken mit Cystein zu erklären, das zur Papain-Aktivierung zugesetzt wurde (5 mM). Das 55 000 d-Fragment zerfiel in ein 26 000 d-Stück und eine L-Kette. Hier dürfte es sich um ein univalentes Fab-Fragment handeln, das aus den ersten zwei Domänen des NH_2-terminalen Endes der μ-Kette und der L-Kette besteht. Das 26 000 d-Fragment entspricht somit dem Fdμ-Stück, welches aus der variablen Region und der ersten konstanten Domäne (C1μ) der μ-Kette besteht. Erst bei fortschreitender Verdauung greift das Papain auch die Peptidbindungen zwischen der zweiten und dritten konstanten Domäne an.
Die Lokalisierung des bei der Verdauung auftretenden 28 000 d-

Fragments, welches bei Reduktion in zwei 13 000 d-Bruchstücke zerfällt, war mit immunchemischen Methoden nicht möglich. Seine Größe spricht für das Vorliegen eines Disulfid-gekoppelten Dimers zweier Cμ-Domänen. Dieser Hypothese entsprechend zeigte das Anti λ-Serum keine Reaktion mit dem 28 000 d-Bruchstück. Da dieses Fragment nicht zur Immunisierung verwendet wurde, unterblieb eine weitergehende Analyse.
In Bezug auf die schweren Ketten des IgM kann zusammenfassend gesagt werden, daß nach standardisierter Papainverdauung zwei Fdμ-Bruchstücke mit dem apparenten Molekulargewicht von 26 000 d und 44 000 d entstehen.
Bei längerer Einwirkungszeit (4 Stunden) von Papain auf partiell reduziertes IgM104E wurde das 30 000 d-Fragment völlig zerstört (siehe Abb. 19, Bahn e). Nach weiteren 8 Stunden war auch das Fd44000 zerstört und die verbleibenden höhermolekularen Bruchstücke bestanden vor allem aus Fd26000 und L-Ketten (Abb. 19, Bahn f).

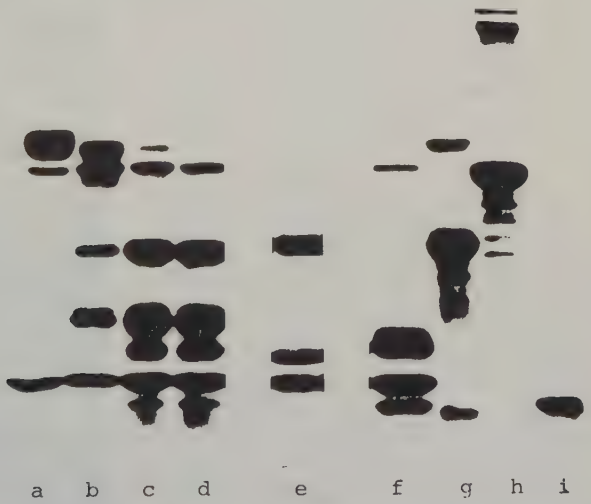


Abb. 19: Analyse des IgM-Verdauungsgemisches zu verschiedenen Zeiten der Papain-Einwirkung mit Hilfe der SDS-Disc-PAGE (10-17.5 % Gel, reduziert)

Dauer der Papain-verdauung von IgM:		Marker:	
a: 0 min	d: 60 min	g: Ovalbumin	(45 000 d)
b: 10 min	e: 4 Std.	h: BSA	(67 000 d)
c: 30 min	f:12 Std.	i: Myoglobin	(18 000 d)

Zur weiteren Absicherung der oben aufgeführten Ergebnisse wurden zum Nachweis der L-Ketten folgende immunchemischen Experimente angeschlossen:

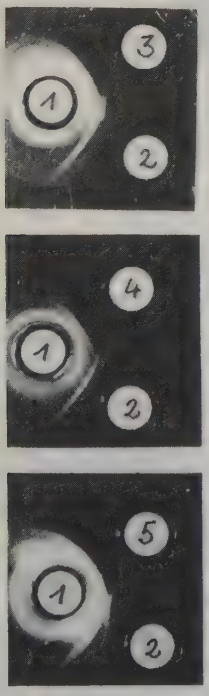
a) ID-Test nach Ouchterlony:

Mit einem Kα-λ-Serum ließen sich auf dem isolierten 135 000 d-Fragment (15 min Verdauung) und auf dem 100 000 d, 72 000 d und 55 000 d-Fragment (4 Std. Verdauung) L-Ketten-Determinanten eindeutig nachweisen. Das 65 000 d-Fragment der 15 min-Verdauung dagegen ergab keine Reaktion mit dem Anti-λ-Serum (siehe Abb. 20).

a) ID-Test der Fragmente nach 15 min-Papain-Verdauung

1,2 Kaninchen Anti-λ AS
3 M IgM104E
4 135 000 d-Fragment
5 65 000 d-Fragment

b) ID-Test der IgM-Fragmente der 2 Std.-Papain-Verdauung



1 Kaninchen Anti-λ AS
2 M IgM104E
3 100 000 d-Fragment
4 72 000 d-Fragment
5 55 000 d-Fragment

Abb. 20: ID-Test der isolierten IgM-Fragmente nach Papain-Verdauung (15 Minuten und 2 Stunden).

b) Immunelektrophorese (IE)

Das Verdauungsgemisch (1 Std. verdaut) wurde immunelektrophoretisch aufgetrennt und mit Kaninchen-Anti-λ-Ketten-AS und Kaninchen-Anti-IgM104E-AS entwickelt.
Dabei zeigte sich folgendes Bild:

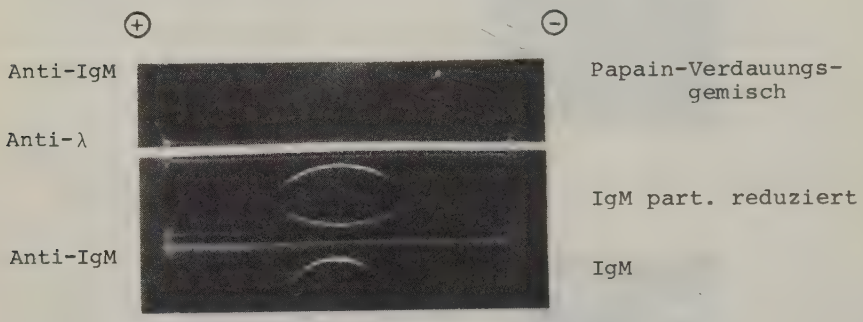


Abb. 21: Immunelektrophoretische Auftrennung des Papainverdauungsgemisches von IgM104E (1 Std. verdaut).

Bei der partiell reduzierten IgM-Probe kommt es zu einer Verbreiterung der IgM-Linie, die durch schnellere Diffusion der Fragmente erklärbar ist. Im Papain-Verdauungsgemisch werden vom αIgM-Antiserum zwei Linien präzipitiert, während das αλ-AS nur eine Präzipitationslinie zeigt. Somit handelt es sich bei der stärker anodisch wandernden Komponente um ein Molekül ohne λ-Ketten-Determinanten. Die anodische Wanderung und das Fehlen der L-Determinanten identifizieren dieses Bruchstück als Fc-Teil.

c) Affinitätschromatographie

Um aus dem Verdauungsgemisch Fragmente mit L-Ketten entfernen zu können, wurde die Affinitätschromatographie mit insolubilisiertem Kaninchen α-λ-AK eingesetzt. Das alky-

lierte Verdauungsgemisch wurde über eine Kaninchen-Anti-λ-Ketten-IgG-Säule passiert. Fab-Bruchstücke des IgM mit kovalent gebundener leichter Kette (bei dem verwendeten IgM104E vom λ_1-Typ) sollten an der Säule binden und eluierbar sein. Das Effluens und die vereinigten Eluate wurden jeweils in der SDS-Disc-PAGE untersucht. Dabei zeigte sich (siehe Abb. 22), daß im Effluens das 30 000 d-Bruchstück angereichert war, d.h. im Gegensatz zu den Fd-Fragmenten 26 000 und 44 000 nicht retardiert wurde.

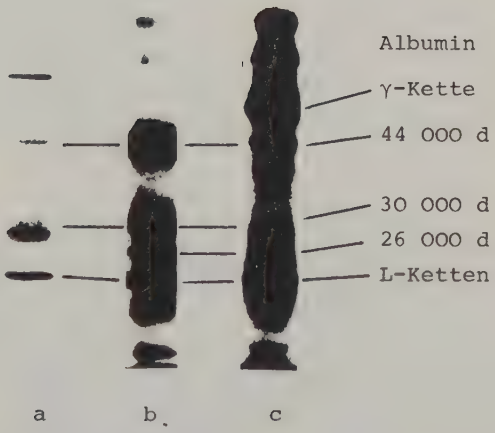


Abb. 22: Analyse des Papain-Verdauungsgemisches durch Auftrennung mit Hilfe einer Kaninchen Anti-λ-Ketten-Säule (10 % SDS-Disc-PAGE, reduziert)

a Effluent der Kaninchen αλ-Säule bei Auftrag von
b IgM-Verdauungsgemisch (Papain, 2 Std.)
c Eluat der Kaninchen αλ-Säule mit 0.5 M Essigsäure/ 0.5 M Ammoniumhydroxyd

Nach Elution mit Säure und Lauge waren vor allem das Fd44000-Fragment und L-Ketten nachweisbar. Das im Verdauungsgemisch in geringerer Menge vorhandene Fd26000 konnte nicht identifiziert werden.
Darüber hinaus vorhandene Banden bei 50 000 d (γ-Kette) und 67 000 d (Albumin) app. Molekulargewicht sind auf ein "Lecken" der Antikörper-Säule zurückzuführen. Dieser "leakage"-Effekt war bei dieser speziellen Affinitätssäule auch noch nach wiederholten Elutionen und Waschungen vorhanden.
Somit führte die α-λ-Affinitätschromatographie nicht zu einer effizienten Anreicherung von L-Ketten-enthaltenden IgM-Fragmenten.

Zusammenfassung der Verdauungsergebnisse mit Papain

Die kinetische Analyse der Papain-Spaltprodukte in der PAGE, kombiniert mit immunchemischen Untersuchungen, erlaubt in erster Näherung die Aufstellung eines Schemas, das unter Zuhilfenahme der über das IgM104E mitgeteilten Aminosäuresequenz realistisch sein dürfte (siehe Abb. 23).

Abb. 23: Schema der bei Papainverdauung von IgM104E entstehenden Fragmente.

3.2.3. Isolierung der Fdμ-Fragmente

Für die Herstellung von Fd44000 und Fd26000 wurde 1-4 Stunden mit Papain verdautes IgM104E verwendet. Die Isolierung erfolgte mi-tels präparativer SDS-Disc-PAGE in 12.5 %-Gelen wie sie bei der μ-Ketten-Präparation beschrieben wurde (siehe II, 10.1.2.). Aus den zwei präparativen Gelansätzen mit insgesamt 4 mg IgM-Verdauungsgemisch wurden ca. 0.5 mg Fd26000 und 0.7 mg Fd44000 gewonnen.
Die Reelektrophorese dieser isolierten Fd26000 und Fd44000-Fragmente zeigt die Abb. 15.

3.2.4. Perjodat-Oxidation der isolierten IgM-Fragmente

Nach Robinson et al. (67) machen Oligosaccharide etwa 13 % des Molekulargewichtes von μ-Ketten des IgM104E aus. Um eine Kreuzreaktion von Antikörpern gegen Zuckerreste auf IgM-Molekülen und auf der T-Zelloberfläche zu vermeiden, wurde ein aliquoter Teil der IgM-Fragmente vor der Immunisierung einem oxidativen Abbau der Zuckerreste unterzogen.
Um die Zerstörung von wichtigen Antigen-Determinanten der Proteine bei der Oxidation mit Perjodat zu vermeiden, mußte ein Kompromiß zwischen der Vollständigkeit des oxidativen Abbaus der Zucker und der Zerstörung von Aminosäuren geschlossen werden.
Die gewählten, sehr schonenden Bedingungen (0.01 M $NaJo_4$, $4^{o}C$, permanente Dialyse) sollten nach Clamp et al. (147) die Zerstörung von leicht oxidierbaren Aminosäuren wie Cystein und Methionin vermeiden. Die von Andersen et al. (148) beschriebenen Kaninchen-AK zeigten nach 20-stündiger Perjodat-Oxidation unter den hier angewendeten Bedingungen keine Änderung in der Spezifität, jedoch war ihre Präzipitationsfähigkeit um 30 % verringert.
Unter diesen Bedingungen ist allerdings eine quantitative Entfernung der Kohlehydratanteile nicht möglich. So wurden z.B. von Maus IgG etwa 60 % der erfaßten Kohlehydrate zerstört.

Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit isolierten Fab-Fragmenten von Maus IgG und bei isolierten Fd-Teilen der γ-Kette erzielt (siehe Tab. 4). Die Fab-Fragmente wurden durch Papain-Verdauung von MIgG und Isolierung des Fab über eine Protein A-Säule präpariert. Nach Reduktion des Fab-Fragments mit Mercaptoäthanol wurden die Fd-Teile der γ-Kette von den L-Ketten in 6 M Guanidin auf einer Sephadex G 100-Säule abgetrennt. Die Fd-Teile der γ-Kette wurden von Herrn M. Hadam, Inst. f. Immunologie der Universität München, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.
Durch die Oxidation wurden ca. 80 % des Saccharidanteils von Maus IgM p.c. zerstört (siehe Tab. 4). Festzuhalten ist, daß IgM etwa dreimal mehr Kohlenhydrate enthält als IgG (67).

Tabelle 4: Perjodat-Oxidation von Maus-Ig und Maus-IgG-Fragmenten

	Gesamt-Zucker vor Oxidation mit $NaJo_4$ (µg Galaktose-Äquivalente/ 250 µg Probe)	Gesamt-Zucker nach Oxidation mit $NaJo_4$ (µg Galaktose-Äquivalente/ 250 µg Probe)	Zucker-abbau (%)
M IgG	8.1[+)]	3.2	61
M Fab (aus MIgG)	3.1	1.1	65
M Fd (aus γ-Kette)	3.3	1.2	64
M IgM p.c.	25.7	4.9	81

+) Mittelwerte aus 2 Messungen mit Schwankungen von ± 10 %.

Die direkte Bestimmung des Oxidationseffekts auf die µ-Ketten und Fd-26 bzw. Fd-44 Präparationen war mit dem Phenoltest nicht möglich, da trotz extensiver Dialyse das zugesetzte Dithiothreitol (DTT) nicht quantitativ zu entfernen war.

Die Interferenz dieser Pentose lag in allen Proben bei einer Extinktion > 0.5 entsprechend > 20 µg Galaktose (siehe Eichkurve, Abb. 24). Trotz dieser Schwierigkeit kann mit großer Wahrscheinlichkeit analog zur IgG-Situation ein Abbau um 60 bis 80 % der Saccharid-Anteile der µ- und Fdµ-Fragmente angenommen werden. Trotz Anwesenheit von DTT in der zu oxidierenden Probe wurde durch die permanente Dialyse gegen 0.01 M $NaJo_4$ über 20 Stunden die aktuelle Konzentration von 0.01 M $NaJo_4$ am µ- und Fdµ-Fragment gesichert.

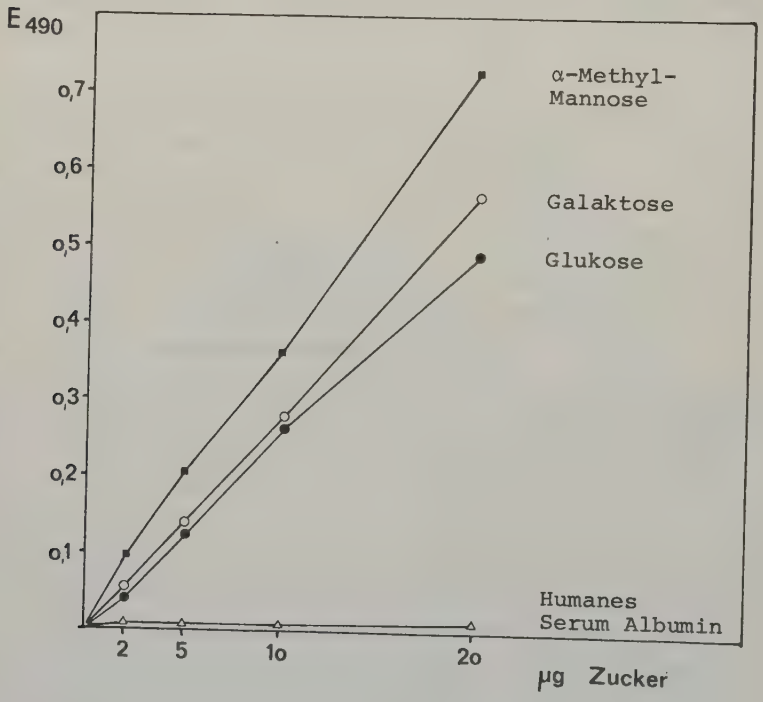


Abb. 24: Eichkurve der Zuckerbestimmung nach Dubois et al. (91) mit verschiedenen Zuckern.

3.2.5. Charakterisierung der Hühner-Antiseren gegen μ-Ketten und Fdμ-Fragmente

Die isolierten μ-Ketten, Fd44000- und Fd26000-Fragmente wurden in oxydierter bzw. in nicht oxidierter Form als CFA-Emulsion in Hühner injiziert (siehe II, 10.6.).
Die Hyperimmunseren zeigten nur eine geringe Präzipitation in der ID nach Ouchterlony. Sie wiesen jedoch zum Teil hohe Antikörpertiter in der Passiven Hämagglutination auf (siehe Tab. 5).
Die affinitätschromatographische Isolierung von AK aus diesen Antiseren erfolgte an einer IgM p.c.-Säule.
Die Ausbeuten an gereinigten Antikörpern sind der folgenden Aufstellung zu entnehmen:

Hühner αμ : 8 mg Ig aus 5 ml Antiserum
Hühner αμ ox : 7 mg Ig aus 5 ml Antiserum
Hühner α Fd44 : 4 mg Ig aus 5 ml Antiserum
Hühner α Fd26ox: 6 mg Ig aus 5 ml Antiserum

(ox = Perjodat oxidiert)

Diese isolierten Antikörper zeigten in der Konzentration von 2 mg/ml Titer in der Passiven Hämagglutination (PH) vergleichbar mit den Ausgangs-Seren (siehe Tab. 5).
Die Absorption mit Maus- und Schaferythrozyten reduzierte den PH - Titer nur unwesentlich.
Die in den folgenden Experimenten als Kontroll-Antikörper verwendeten Hühner-Anti-KLH-Antikörper wurden aus einem HüαKLH-Antiserum präpariert. Aus 10 ml Antiserum waren von einer KLH-Säule (75 mg KLH an 30 ml Sepharose 4B gekuppelt) 35 mg Antikörper eluierbar.

Tabelle 5: Titerbestimmung der individuellen Hühnerantiseren bzw. Antikörper in Passive Hämagglutination[a].

Huhn Nr.	Spezifität[b]	Titerstufe Antiserum		affi.-chrom. gereinigter Antikörper
	Absorption:	Ø	Erythrozyten	Erythrozyten
1	α IgM p.c.	-	2^{-10}	-
2	"	-	2^{-12}	-
3	"	-	2^{-10}	-
40	"	2^{-19}	2^{-15}	2^{-18}
41	"	2^{-11}	-	-
42	"	2^{-13}	-	-
43	"	2^{-7}	-	-
80	"	2^{-13}	2^{-12}	2^{-14}
81	"	2^{-13}	2^{-12}	2^{-15}
101	α μ_{ox}	2^{-7}	2^{-6}	-
102	"	2^{-8}	2^{-4}	2^{-7}
104	α μ	2^{-8}	2^{-7}	2^{-7}
105	"	2^{-9}	2^{-9}	2^{-7}
106	α $Fd26_{ox}$	2^{-7}	2^{-6}	2^{-5}
107	α Fd26	2^{-5}	2^{-5}	-
108	α $Fd44_{ox}$	2^{-3}	2^{-3}	-
109	"	2^{-4}	2^{-4}	-
110	α Fd44	2^{-6}	2^{-6}	2^{-5}

a) Zur Hämagglutination wurden Schaferythrozyten verwendet, auf deren Oberfläche Maus IgM p.c. gekuppelt war (siehe II, 12.2.)

b) Präimmunseren und Hühner αKLH Antiseren sowie gereinigte Antikörper zeigten eine Agglutination < 2^{-3}.

4. Immun-Radioautographische Analyse der Bindung von Kaninchen- und Hühner-Anti μ-Antikörpern auf Maus-Lymphozyten

In der Radioautographie (RAG) wurden folgende affinitätschromatographisch gereinigte AK auf Bindung an Lymphozyten getestet:

Kaninchen-AK:

1) Kaninchen Anti-IgM p.c.-AK
2) Kaninchen Anti-Maus μ-Ketten spezifische AK

Hühner-AK:

3) Hühner Anti-Maus-IgM p.c.-AK
4) Hühner Anti-Maus μ-Ketten-AK
5) Hühner Anti-Maus IgG-AK
6) Hühner Anti-BSA-AK

Die Bindungscharakteristik der Antikörper auf Milz- und Thymuszellen geht aus Tabelle 6 hervor.

Tabelle 6: Radioautographische Analyse der Bindung gereinigter Antikörper auf Milz- und Thymuszellen der Maus

	Milzzellen (% positiv)	Thymuszellen (% positiv)
1) K α M IgM p.c.	62	2
2) K α M μ-Kette	40	0
3) Hü α M IgM p.c.	48	65
4) Hü α M μ-Kette	62	61
5) Hü α M IgG	36	2
6) Hü α BSA	3	0

Die %-Werte sind Mittelwerte aus zwei maximal ± 15 % voneinander abweichenden Bestimmungen.

Auffallend ist, daß die α-IgM p.c. und αμ-Antikörper vom Kaninchen auf Thymuszellen keine Bindung zeigten im Gegensatz zu den entsprechenden Antikörpern vom Huhn, die etwa 60 % der Thymuszellen anfärbten.
Milzzellen dagegen wurden von den αIgM- und αμ-Antikörperpräparationen beider Spezies zu 40 - 60 % markiert.
Die ebenfalls getesteten Hühner αMIgG-AK färbten 36 % der Milzzellen, jedoch nicht Thymuszellen. Die zur Kontrolle unspezifischer Markierung eingesetzten Hühner Anti BSA-Antikörper zeigten durchweg keine Reaktion.

5. Indirekte Immunfluoreszenz mit Hühner-Antiseren und gereinigten Antikörpern

Nachdem mit Hilfe der empfindlichen Radioautographie die Bindung der Hühner Anti-IgM p.c. Antiseren auf Maus-Lymphozyten gezeigt war, wurde für die weiteren Untersuchungen vor allem die indirekte Immunfluoreszenz verwendet. Diese Methode ist zwar weniger empfindlich, doch sie führt mit geringerem Aufwand zu schnelleren Ergebnissen.
Die Hühner-Antiseren und gereinigten, μ-spezifischen Antikörper gegen Maus IgM zeigten unter den beschriebenen Bedingungen (siehe II, 15.1.) auf Maus-B-Lymphozyten eine starke Ringfluoreszenz, die weit über der Intensität der Fluoreszenz der Kontroll-Antikörper (Hühner αKLH, Normales Hühner Ig) lag. Vereinzelt war auch eine fleckförmige Immunfluoreszenz zu beobachten.
Im Gegensatz zu B-Lymphozyten zeigten die T-Zellen eine viel schwächere, feinkörnige Ringfluoreszenz, die eindeutig über dem Niveau der Kontroll-AK lag. Die Hühner Anti-KLH-Antikörper zeigten auf einem wechselnden Anteil der untersuchten B- und T-Lymphozyten eine feine, diffuse Anfärbung, die an der Grenze der Auflösung lag.

5.1. Optimierung der Konzentration des ersten Antikörpers (μ-spezifisches Antiserum bzw. Antikörper)

Bei einer optimalen Konzentration an 2. AK führte die Erhöhung des spezifischen Hühner-AS von 20 μl auf 60 μl/15 x 10^6 Zellen zu keiner Erhöhung des Prozentsatzes an fluoreszenzpositiven Zellen.
Das gleiche Ergebnis erbrachte die Variation der Menge des eingesetzten Na_2SO_4-präzipitierter γ-Globuline bei einer Konzentration von 10 mg/ml.
Die affinitätschromatographisch gereinigten spezifischen Antikörper wurden in einer Konzentration von 2 mg/ml verwendet. Bei Einsatz von mehr als 10 μl AK-Lösung pro 10^6 Zellen wurden nicht mehr Zellen angefärbt.

5.2. Optimierung der Konzentration des zweiten Antikörpers

Die Konzentration des zweiten AK, Rhodamin konjugiertes Kaninchen $F(ab')_2$-Anti Hühner Ig, erwies sich als kritisch, da auch die Kontroll-AK (Hü αKLH-Antiserum und affinitätschromatographisch gereinigter AK bzw. normales Hühner Ig) bei hohen Konzentrationen von zweitem Antikörper einen hohen Prozentsatz IF-positiver Zellen verursachten. Deshalb wurde die Konzentration an 2. AK mit Hü αIgM p.c.-Antiserum und mit gereinigten Hü αIgM-AK auf Milz und Thymuszellen titriert. Der Konzentrationsbereich mit spezifischer Anfärbung war bei Thymuszellen deutlich schmaler als bei Milzzellen (siehe Pfeil, Abb. 25a).

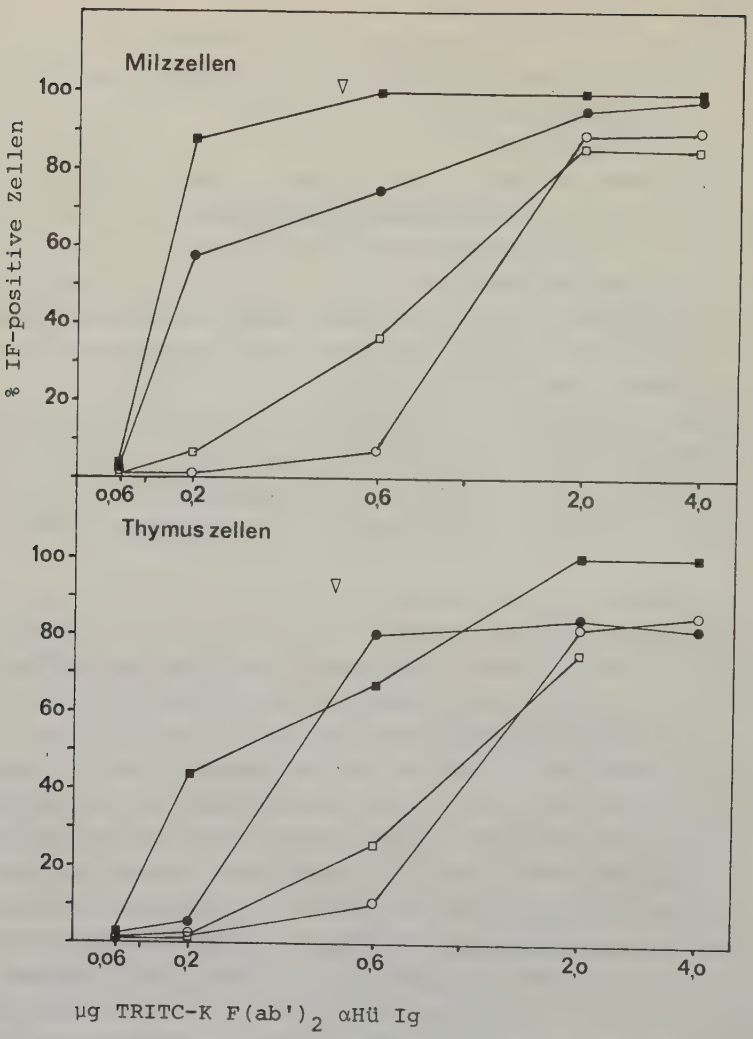


Abb. 25a: Titration der Konzentration des zweiten Antikörpers TRITC-K $F(ab')_2$ α Hü Ig auf Milz- und Thymuszellen in der indirekten Immunfluoreszenz.

- Hü αµ-Antiserum
- Hü αµ-Na_2SO_4-Präzipitat
- Hü αKLH-Antiserum
- Normales Hü-Ig (Cohn II-Fraktion)
- TRITC-K $F(ab')_2$ α Hü Ig allein

Die Markierung ∇ zeigt die optimale Konzentration des zweiten AK für die indirekte IF.

5.3. Ergebnisse der IF-Bindungsstudien von Hühner-Anti-IgM Seren und daraus isolierten Anti-μ-spezifischen Antikörpern

Wie Tab. 7 zeigt, läßt sich ein hoher Prozentsatz (60 - 95 %) von Milzzellen, Thymuszellen und peripheren T-Lymphozyten (zur Charakterisierung der Zellen siehe III, 5.5.) von Hü α IgM p.c.-Antikörpern anfärben. Die Absorption des AS mit Schaferythrozyten (SRBC) reduziert den Anteil der IF-positiven Milzzellen auf etwa 52 %.

Tabelle 7: Bindung von Hühner-Anti IgM p.c. Antiserum auf Maus-Lymphozyten im indirekten Immunfluoreszenztest

	% positive Zellen mit Hü αIgM p.c. Antiserum
Milzzellen	90 ± 9 (5)[x)]
periphere T-Zellen	80 ± 10 (5)
Thymuszellen	57 ± 16 (3)

x) Die angegebenen Prozentzahlen IF-positiver Zellen stellen die Mittelwerte ± Standardabweichung aus (n) unabhängigen Versuchen dar.
Als positiv gezählt wurden nur Zellen mit Ringfluoreszenz über dem Niveau des Hü αKLH-Antiserums bzw. des daraus affinitätschromatographisch gereinigten Antikörpers.

Um die Spezifität der an die Zellmembran bindenden AK besser definieren zu können, wurden μ-spezifische AK aus dem Hü α IgM p.c.-AS durch Affinitätschromatographie präpariert und auf verschiedenen Zellpopulationen der Maus getestet (Tab. 8). Die isolierten, von insolubilisiertem IgM eluierten AK zeigten eine vergleichbar hohe Bindungsrate an Zelloberflächen wie das unfraktionierte Antiserum. Die Absorption mit Maus- und Schaferythrozyten zur Entfernung von AK gegen Zellober-

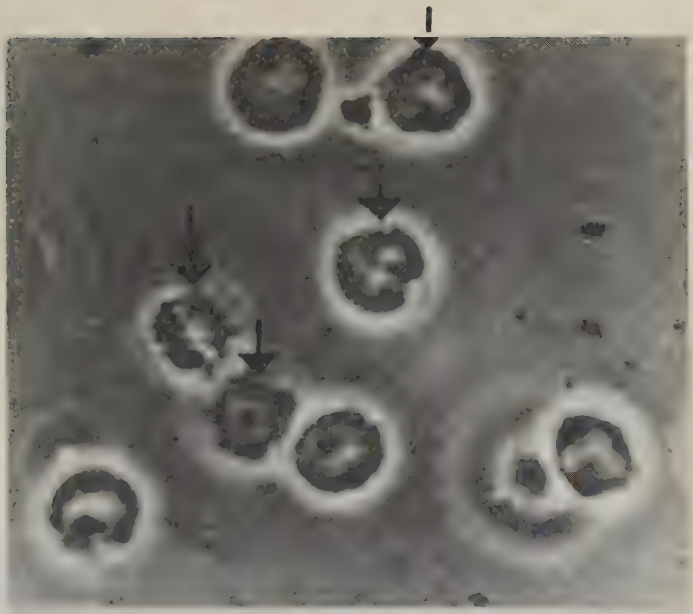
Tabelle 8: Bindung von Hühner Anti-Maus-μ-Ketten spezifischer, gereinigter Antikörper auf Maus-Lymphozyten in der indirekten Immunfluoreszenz

	% positive Zellen mit Hü αμ-Antikörpern		
	Ø	absorbiert mit Erythrozyten	Erythrozyten P815-Mastozytom
Milzzellen	69 ± 23 (5)[x]	68 ± 23 (5)	55 ± 11 (5)
periphere T-Zellen	76 ± 10 (5)	76 ± 7 (4)	61 ± 10 (6)
Thymuszellen	78 ± 11 (3)	83 ± 0 (2)	7 ± 6 (5)
periphere B-Zellen	88 (1)	90 (1)	-
WEHI 7/22	-	84 ± 5 (4)	73 ± 12 (3)

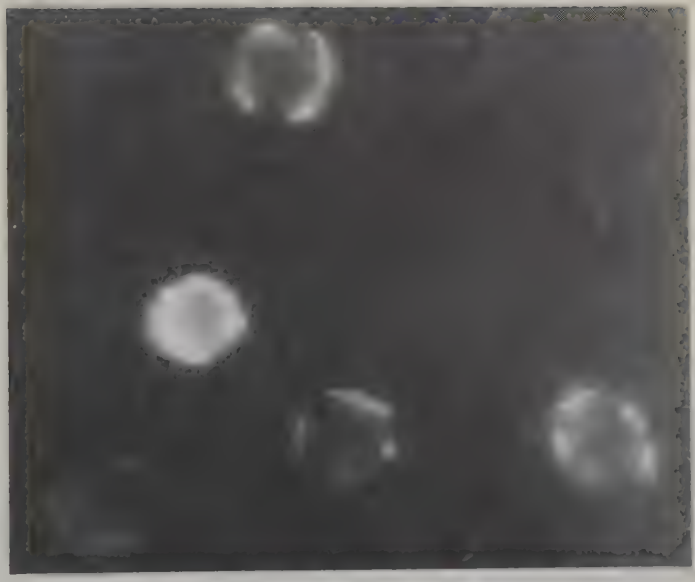
[x] Die angegebenen Prozentzahlen IF-positiver Zellen stellen die Mittelwerte ± Standardabweichung aus (n) unabhängigen Versuchen dar.
Als positiv gezählt wurden nur Zellen mit Ringfluoreszenz über dem Niveau des Hü αKLH-Antiserums bzw. des daraus affinitätschromatographisch gereinigten Antikörpers.

flächen-Kohlenhydrate beeinflußte die Bindung an Determinanten der Zellmembran nicht. Wurden die AK dagegen mit kernhaltigen, nicht Ig-tragenden P815-Mastozytomzellen der Maus absorbiert, ließen sich Milzzellen zu 55 % und periphere T-Lymphozyten zu ca. 60 % noch anfärben, während nur 7 % Thymozyten von den absorbierten Antikörpern erkannt wurden.
Die Bindung der AK an T-Lymphomzellen der Linien WEHI 7 und 22 (etwa zu 80 % IF-positiv) wurde jedoch von der Absorption mit den Mastozytomzellen nicht beeinflußt.

a)
Phasen-
kontrast



b)
Immun-
fluoreszenz
auf Licht



nichtge-
färbte
Zellen

tote Zelle
(unspezifi-
sche zyto-
plasmatische
Anfärbung)

Abb. 25b: Immunfluoreszenz von Hühner Anti-μ-Antikörpern auf peripheren T-Zellen (Hühner AK absorbiert mit MRBC, SRBC und P815-Mastozytomzellen)

5.4. Bindung von Hühner Antiseren gegen isolierte μ-Ketten, Fdμ26000 und FDμ43000 in der indirekten Immunfluoreszenz

Hühner-Antiseren gegen isolierte μ-Ketten und Fdμ-Fragmente zeigten nur geringe Titer in der Passiven Hämagglutination (siehe Tab. 5), dennoch konnte in der indirekten IF (nach Absorption mit Schaferythrozyten) eine Bindung auf Maus-Lymphozyten nachgewiesen werden.
Die Hü αμ-AK (Tab. 9) färbten weniger als die Hälfte der an Nylon-Wolle gereinigten T-Zellen, während fast alle Thymozyten mit den Antikörpern reagierten.

Tabelle 9: Bindung von Hühner Antiseren und gereinigten Antikörpern gegen isolierte μ-Ketten auf Maus-Lymphozyten in der indirekten Immunfluoreszenz

	% positive Zellen mit		
Absorption:	Antiserum (Hü αμ) Erythrozyten	Na_2SO_4-Präzipitat Erythrozyten	affinitätschromatographisch gereinigter Antikörper Erythrozyten
Milzzellen	79 ± 6 (2)	75 ± 18 (6)	50 ± 17 (2)
periphere T-Zellen	25 (1)	38 ± 2 (2)	40 ± 15 (2)
Thymuszellen	70 ± 15 (3)	73 ± 26 (5)	86 ± 6 (2)
WEHI 7/22-Zellen	-	-	82 ± 12 (2)

Antikörper gegen oxidierte μ-Ketten (Tab. 10) mit stark verringerten Zuckeranteilen zeigten bei vergleichbarem Bindungsverhalten auf Milz- und peripheren T-Zellen eine stark reduzierte Anfärbung der Thymuszellen.
Hü-Antikörper, gegen Fdμ44000 induziert, färbten etwa ein Drittel der peripheren T-Zellen und Thymozyten (Tab. 11), während Hühner Anti-$Fd\mu 26000_{ox}$-Antikörper etwa 60 % der pe-

ripheren T- und etwa 75 % der Thymuszellen erkannten (Tab. 12). Damit markierten die Hühnerantikörper gegen oxidiertes Fdμ26000 als einzige unter den Anti-IgM Fragment-Antikörpern mit oxidiertem Antigen einen Großteil der Thymozyten und peripheren T-Zellen.

Tabelle 10: Bindung von Hühner Antiseren und gereinigten Antikörpern gegen isolierte und oxidierte μKetten auf Mauslymphozyten in der indirekten Immunfluoreszenz

	% positive Zellen mit		
Absorption	Antiserum (Hü $\alpha\mu_{ox}$) Erythrozyten	Na_2SO_4-Präzipitat Erythrozyten	affinitätschromatographisch gereinigter Antikörper Erythrozyten
Milzzellen	50 ± 32 (2)	27 ± 1 (3)	42 ± 8 (3)
periphere T-Zellen	25	34	35 ± 13 (3)
Thymuszellen	30 ± 13 (4)	49 ± 16 (3)	35 ± 17 (3)
WEHI 7/22-Zellen	-	-	89 ± 5 (4)

Tabelle 11: Bindung von Hühner Antiseren und gereinigten Antikörpern gegen oxidiertes Fdμ26000 auf Maus-Lymphozyten in der indirekten Immunfluoreszenz

	% positive Zellen mit		
Absorption	Antiserum (Hü α $Fd26000_{ox}$) Ø	Na_2SO_4-Präzipitat Ø	affinitätschromatographisch gereinigte Antikörper Erythrozyten
Milzzellen	67 ± 19 (3)	72 ± 16 (3)	74 ± 10 (4)
periphere T-Zellen	25 (1)	32 (1)	59 ± 20 (4)
Thymuszellen	20 ± 7 (3)	54 ± 20 (3)	75 ± 5 (3)
WEHI 7/22-Zellen	-	-	91 ± 5 (4)

Tabelle 12: Bindung von Hühner-Antiseren und gereinigten Antikörpern gegen Fdμ44000 auf Maus-Lymphozyten in der indirekten Immunfluoreszenz

	% positive Zellen mit		
Absorption	Antiserum (Hü α Fd44000) Ø	Na_2SO_4-Präzipitat Ø	affinitätschromatographisch gereinigte Antikörper Erythrozyten
Milzzellen	14 ± 7 (3)	33 ± 15 (3)	45 ± 15 (5)
periphere T-Zellen	20 ± 13 (2)	11 ± 1 (2)	33 ± 18 (2)
Thymuszellen	36 ± 15 (2)	33 ± 18 (2)	29 ± 5 (3)
WEHI 7/22-Zellen	-	-	92 ± 3 (4)

Eine Absorption der Antikörper mit T-Lymphom-Zellen der Linie WEHI 22 reduzierte die Anfärbung von peripheren T-Zellen auf 14 %.
Thymuszellen zeigten keine Reaktion mehr. Wurden die gereinigten Antikörper mit insolubilisiertem IgM p.c. absorbiert, konnte eine Bindung an Thymozyten oder periphere T-Lymphozyten in der IF nicht mehr nachgewiesen werden.
Die Absorption der AK mit P815-Zellen hatte dagegen keinen wesentlichen Einfluß auf ihre IF-Reaktivität.
Auffallend war, daß alle Anti-μ- und Anti-Fdμ-Antikörper etwa 90 % der T-Lymphomzellen der Linien WEHI 7 und WEHI 22 anfärbten.

5.5. Charakterisierung der T-Zell Population aus Milzzellen nach Filtration über Nylon-Wolle

Neben den Thymuszellen, die überwiegend aus unreifen T-Lymphozyten bestehen (154), sollten auch T-Zell-Population mit überwiegend reifen T-Lymphozyten eingesetzt werden. Diese, auch als "periphere T-Lymphozyten" bezeichneten Zellen wurden durch zweimalige Passage von Milzzellen normaler Mäuse über Nylon-Wolle angereichert. Dabei adherieren B-Lymphozyten und Makrophagen an die Nylon-Fäden, während die T-Lymphozyten ausgewaschen werden können.
Die unter II, 13.4.3. näher beschriebenen Methoden der indirekten Immunfluoreszenz und der Komplement-Lyse mit Anti-Theta-Serum erbrachte folgende Ergebnisse: Wie Tab. 13 zeigt, nimmt der Anteil der B-Lymphozyten nach Filtration von Milzzellen durch Nylonwolle von 47 % auf 7 % ab.

Tabelle 13: Indirekte Immunfluoreszenz mit affinitätschromatographisch gereinigten Kaninchen-Antikörpern spezifisch für Maus-Immunglobuline und Maus-μ-Ketten.

Zelltyp	% IF-positive Zellen[x] mit K αμ	K αIg
Milzzellen	46	48
periphere T-Zellen	7	11
Thymuszellen	0	0

x) Die angegebenen Prozentzahlen sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Bestimmungen mit Abweichungen < 10 %.
Als zweiter Antikörper diente FITC-gekuppelter Ziege Anti-Kaninchen Ig-AK.

Der Anteil an T-Zellen in der peripheren T-Zell-Population wurde mit einem Anti-Thy1-Antiserum und Komplement bestimmt.

Dabei wurde Maus-Antiserum (AKR/D anti C3H) mit Spezifität gegen das allen T-Zellen gemeinsame Thy1-Antigen zusammen mit Kaninchen-Komplement (C) eingesetzt.

Tabelle 14: Charakterisierung der peripheren T-Zellen durch Komplement-Lyse mit Anti-Theta-Antiserum

Zellpopulation	% lysierte Zellen mit M αΘ-AS und C
Milzzellen	45 %
periphere T-Zellen	80 %
Thymuszellen	85 %

Die Zahl der toten Zellen bei Testende ohne AS und C betrug 10 %, ohne AS mit C 25 %.

Wie in Tab. 14 dargestellt, sind ca. 80 % der T-Zellen lysierbar, während nur 45 % der Milzzellen mit AK + C lysiert werden.

6. Analyse der radiojodierten Lymphozyten-Oberflächenproteine

Nachdem in der Radioautographie und Immunfluoreszenz die Bindung von Hühner-αμ-Antikörpern an T-Zellen demonstriert war, sollte die Natur der erkannten Oberflächenmoleküle näher untersucht werden.
Die biochemische Untersuchung der markierten Membranproteine erschien wesentlich, da trotz der demonstrierten Spezifität der Antikörper auf Grund der Bindungsteste allein keine Aussage zur Identität der reagierenden Moleküle auf den T-Lymphozyten gemacht werden kann. Zur Klärung dieses Problems

sollten mit Hilfe der Immunpräzipitation von radiojodierten Zelloberflächenproteinen die in den Bindungstests erkannten Strukturen näher charakterisiert werden.

6.1. Optimierung der Laktoperoxidase katalysierten Jodierung mit I125 der Zellmembran

Ausgehend von der Methode von Marchalonis (101) zur Radiojodierung von Zelloberflächenproteinen normaler Lymphozyten, die statt der beschriebenen 30 - 40 % nur etwa 12 % des eingesetzten trägerfreien Jod-125 einbaute, wurde versucht, durch Zugabe von "kaltem" Jod-127 einen höheren Einbau zu erzielen.
Tab. 15 zeigt die Steigerung des Einbaus auf etwa das Doppelte. Nach Lyse der zu mehr als 95 % vitalen Zellen wurde adsorbiertes, freies Jod-125 von kovalent gebundenem Jod über eine Sephadex-G25-Säule abgetrennt. Die proteingebundene Aktivität wurde durch Trichloressigsäure-Präzipitation bestimmt. Sie betrug 1.0 bis 1.7 % der zellgebundenen Aktivität (siehe Tab. 15).
Da obige Jodierungsmethode, für kleine Lymphozyten entwickelt, bei T-Lymphom-Zellen der Linie WEHI 22 nur etwa 2 % der eingesetzten Aktivität an die Zellen band, wurde die von Haustein (103) für T-Lymphomzellen entwickelte Methode mehrmaliger Zugabe von LPO und H_2O_2 bei 30°C getestet. Diese Technik wurde von A. Kleinschmidt (152) für P815-Mastozytomzellen optimiert. Sie gestattete den Einbau von etwa 14 % der eingesetzten I-125-Aktivität. Ohne weitere Modifikationen erwies sie sich als zumindest gleichwertig mit der Methode von Marchalonis ohne Zusatz von "kaltem" Jodid (siehe Tab.16) in Bezug auf die zellgebundene Aktivität. Die Aktivität in der hochmolekularen Fraktion des Zell-Lysats war sogar zwei- bis dreifach höher.
Aus diesem Grund und wegen der möglichen Zerstörung von Antigen-Determinanten der Oberflächen-Proteine durch die größere Menge voluminöser "kalter" Jod-Atome wurden alle Zellpopula-

Tabelle 15: Steigerung des I-125-Einbaus in Maus-Milzzellen durch Zugabe von "kaltem" I-127 (Marchalonis-Methodik)

Eingesetzte Aktivität					
I-125	mCi:	1	1	1	1
	cpm:		1.8×10^9		
I-127 entspr.	mCi:	0	1	4	10
Jodid-Menge total	(nM)	0.6	1.2	3.0	6.6
zellgebundene Aktivität (cpm)		22.5×10^7	30.0×10^7	40.2×10^7	34.7×10^7
% der eingesetzten Aktivität		12.5 %	16.7 %	22.3 %	19.3 %
Aktivität in der hochmolekularen Fraktion des Zelllysates (G25-Ausschlußvolumen) (cpm)		1.33×10^7	1.88×10^7	2.17×10^7	3.42×10^7
% der eingesetzten Aktivität		0.74 %	1.04 %	1.21 %	1.9 %
% der zellgebundenen Aktivität		5.9 %	6.2 %	5.39 %	9.85 %
TCA-präzipitierbare Aktivität (cpm)		2.80×10^6	2.93×10^6	2.75×10^6	5.75×10^6
% der eingesetzten Aktivität		0.15 %	0.16 %	0.15 %	0.31 %
% der zellgebundenen Aktivität		1.2 %	0.97 %	0.68 %	1.65 %
% der G25-Ausschlußvolumen-Aktivität		21 %	15.6 %	12.7 %	16.8 %

Tabelle 16: Effizienz der Radiojodierung verschiedener Maus-Zellpopulationen (Haustein-Methodik in der Modifikation nach A. Kleinschmidt)

Zell-population	zellgebundene Aktivität % der eingesetzten Aktivität	G25-Ausschlußvolumen assoziierte Aktivität des Zell-Lysats % der eingesetzten Aktivität	% der zellgebundenen Akt.
Milz	11.4 ± 1 (3)	3.4 ± 0.6 (2)	30.0 ± 9 (2)
Lmyphknoten	9.2 (1)	4.0 (1)	43 (1)
nu/nu Milz	10.3 ± 5.5 (2)	3.1 ± 0.1 (1)	36 ± 17 (2)
periphere T-Zellen	10.6 ± 0.5 (3)	3.5 ± 0.3 (3)	33 ± 2 (3)
Thymus	7.9 ± 4.4 (3)	2.2 ± 1.1 (3)	47 ± 18 (3)
WEHI 22	14.7 ± 0.8 (2)	6.9 ± 2.8 (2)	46 ± 16 (2)
MLC-Blasten	9.4 (1)	6.0 (1)	35 (1)

tionen für die folgenden Immunpräzipitationen nach Haustein in der Modifikation von A. Kleinschmidt jodiert.
Die Einbauraten sind in Tab. 16 aufgeführt. Die zellgebundenen Aktivitäten liegen zwischen 9 und 14 % der eingesetzten I-125-Menge. Etwa 30 bis 50 % der eingebauten Radioaktivität fand sich im Ausschlußvolumen der Sephadex-G25-Säule.
Nach Abtrennung von freiem Jod-125 über Sephadex G25 waren 18 - 20 % der Aktivität des Ausschlußvolumens mit TCA präzipitierbar.

6.2. Immunpräzipitation der Lysate radiojodierter Maus-Lymphozyten

Für die Immunpräzipitation der Lysate wurde eine Antikörper-"Sandwich"-Methode eingesetzt.
Zunächst war der Einfluß verschiedener Mengen an 1. und 2. Antikörper auf die präzipitierbare Radioaktivität aus den Lysaten von radiojodierten Maus-Lymphozyten zu untersuchen.
Die markierten Zellen wurden mit einer 0.1 % Lösung des nichtionischen Detergens Triton X-100 lysiert. Die sehr geringe Detergens-Konzentration, die unterhalb der kritischen Mizellenkonzentration liegt, erlaubt nach Cone et al. (122) eine effektive Extraktion von Immunglobulinen aus T-Lymphozyten im Gegensatz zur B-Zell-Ig-Extraktion, die ca. 0.5 % Triton X-100 erfordert.
Zur Optimierung des Präzipitationssystems mit Hühner-Antiseren wurden 15 bis 60 µl spezifischen Hü αIgM p.c.-Antiserums und 100 µl des Zell-Lysates verschiedener radiojodierter Maus-Lymphozytenpopulationen präzipitiert. Der Komplex aus Membran-Ig und Hühner-AK wurde mit K αHü Ig-Antiserum kopräzipitiert (50 - 200 µl).
Tab. 17 zeigt, daß es im Falle des Milzzell-Lysates bei Verdopplung des 1. AK von 15 µl auf 30 µl bei gleichbleibender Menge an 2. AK (100 µl) nur zu einem geringen Anstieg der immunpräzipitierten Radioaktivität kommt.
Verdopplung der Mengen an 1. AK (50 µl) und 2. AK (200 µl) führt nur zu einer 12 %igen Steigerung der Aktivität des Präzipitats.
Im Falle der Lymphknoten-Zellysate führte die Erhöhung von 15 µl auf 30 µl des 1. AK bei gleichbleibender Menge des 2. AK (100 µl) zu einer 2 - 4fach höheren Aktivität im Präzipitat, während in Thymozyten-Lysaten nur eine 8 %-Steigerung der präzipitierten Aktivität bei Verdopplung des 1. AK auftrat.
Die höchste Radioaktivität präzipitierte eine Kombination von 30 µl Hühner-AS und 100 µl K αHühner Ig-AS bei Vorlage von 100 µl Zell-Lysat; hier wurden 0.35 % im Falle der Milzzellen bzw. 0.8 % (Thymuszellen) bis 1.5 % (Lymphknotenzel-

len) der eingesetzten Radioaktivität des Zell-Lysates immunpräzipitiert.

Tabelle 17: Abhängigkeit der Immunpräzipitation in Zell-Lysaten von verschiedenen Konzentrationen des ersten Antikörpers (Hü αMIgM p.c.-Antiserum) und des zweiten Antikörpers (K αHüIg-Antiserum).

1. AK (HüαM-IgMp.c.-AS) (µl)	2. AK (KαHüIg-AS) (µl)	Immunpräzipitate aus Lysaten[x] radiojodierter Milzzellen (cpm)	Lymphknoten (cpm)	Thymuszellen (cpm)
15	50	10300±200 (2)	-	-
15	100	12100±400 (2)	17100±4000(4)	14700±3100(4)
30	50	9300±300 (2)	-	-
30	100	14800±900 (2)	31000±9000(4)	16000±2100(4)
60	100	11700±1100(2)	-	-
60	200	16800±1300(2)	-	-

x) eingesetzt wurden 100 µl Zell-Lysat ($1x10^7$ radiojodierte Zellen in 1 ml Lysepuffer mit 0.1 % Triton X-100) mit $4.3x10^6$ cpm (Milzzellen) bzw. $2x10^6$ cpm (Lymphknoten- und Thymuszellen)

Mit affinitätschromatographisch gereinigten Hühner αµ-Antikörpern konnten deutlich höhere Radioaktivitäten aus den Zell-Lysaten präzipitiert werden. Tab. 18 zeigt, daß etwa 2.3 % der Ausgangs-Aktivität des Zell-Lysates von Nylonwolle-gereinigten T-Zellen immunpräzipitiert wurde. Die Absorption des gereinigten Hü αµ-AK mit Erythrozyten von Schaf und Maus sowie P815-Mastozytomzellen war ohne wesentlichen Einfluß auf die Präzipitatmenge.

Da die Analyse der Präzipitate in der SDS-Disk-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen eine nur unbefriedigende Ausbeute der gesuchten Moleküle im µ-Ketten-Bereich erbrachte, war es notwendig, die spezifischen Präzipitate wei-

ter anzureichern. Da kleinere Immunkomplexe aus Antigen + Hü αμ-AK + K αHüIg-AK schlecht zentrifugierbar sind und möglicherweise so beim Waschen der Präzipitate verlorengehen, sollten alle Komplexe an Staphylococcus aureus (Staph. A.) gebunden werden. Staph. A. besitzt Rezeptoren für die Fc-Teile von Kaninchen IgG (109,110), doch können auch Komplexe aus Antigen- und Hühnerantikörpern direkt binden (111).

Tabelle 18: Einfluß der Absorption der Hü αμ-Antikörper mit verschiedenen Zelltypen auf die Immunpräzipitation der Zell-Lysate

1. AK (Hüαμ-AK) (2 mg/ml)	2. AK (KαHüIg-AS)	Immunpräzipitate aus Lysaten radiojodierter peripherer T-Zellen[x] Hü αμ-AK absorbiert mit:		
		Ø	SRBC MRBC	SRBC MRBC P815
(μl)	(μl)	(cpm)	(cpm)	(cpm)
10	100	104 000[xx] ±22 000	72 000 ± 9 000	67 000 ±16 000
30	100	93 500 ±26 000	80 000 ±18 000	91 000 ±14 000

x) Pro Immunpräzipitation wurden 100 μl Zell-Lysat (0.1 % Triton X-100) mit 4.3×10^6 cpm eingesetzt

xx) Die angegebenen Aktivitäten sind Mittelwerte aus zwei bis vier unabhängigen Präzipitationen ± Standardabweichung

Tab. 19 zeigt, daß die präzipitierbare Radioaktivität durch Zugabe von Staph. A um den Faktor 2 angereichert werden kann. Diese Verdopplung der Aktivität des Immunpräzipitats ist unabhängig davon, ob 10 oder 30 μl an 1. AK (Hü αμ-AK) verwendet wurden.

Zur Verringerung der in III, 6.3. gezeigten hohen Untergrundaktivität der fraktionierten Gele sowie vor allem zur Klärung der Frage, ob das in wechselnden Mengen auftretende Molekül

Tabelle 19: Einfluß der Menge an Staphylococcus aureus (Staph. A.) auf die Ausbeute des Hü αμ-AK/ KαHüIg-AS-Präzipitationssystems mit Lysaten von peripheren T-Zellen

1. AK (Hüαμ-AK) (μl)	2. AK (KαHIg-AS) (μl)	Staph. A. (10 %ige Suspension) (μl)	Präzipitatmenge nach Elution von Staph. A. Exp. 1 (cpm)	Exp. 2 (cpm)
10	100	0	89 000	120 000
		50	207 000	-
		100	245 000	194 000
		200	234 000	-
30	100	0	110 000	121 000
		50	230 000	-
		100	257 000	189 000
		200	313 000	-

von 35-45 000 d spezifisch präzipitiert oder sekundär an den bestehenden Immunkomplex adsorbiert (wie z.B. Fc-Rezeptoren), wurde eine Reihe von Versuchen mit Vorpräzipitation unternommen. Dazu wurde durch Zugabe von 5 μl 1:10 verdünnten, normalen Mausserums und 50 μl Kaninchen α Maus-Serum-Antiserums zu jeweils 100 μl Zell-Lysat ein Präzipitat erzeugt. Nach dessen Entfernung mit 100 μl Staph. A.-Suspension folgte der spezifische Präzipitationsschritt mit Hü αμ-AK, K αHüIg-AS und Staph. A. Um auch geringste Mengen an solubilisiertem Membran-Ig zu erfassen, wurde einem Teil der Lysate nach Inkubation mit 1. AK noch IgM p.c. (10 μg) zugesetzt. Dadurch wird die Initiation der Präzipitation des Hü αμ-AK erleichtert und eine Mitpräzipitation der gesuchten Membranproteine gefördert.

Um den Verlust der entsprechenden Strukturen durch die von Cone (1972) beschriebene unvollständige Solubilisierung von Membranproteinen durch 0.1 % Triton X-100 zu vermeiden, wurden alternativ radiojodierte Lymphozyten auch mit 0.1 % Tri-

ton X-100 in 10 M Harnstoff und 0.5 M Essigsäure lysiert. Den Effekt einer Vorpräzipitation, verschiedener Lyse-Puffer und der Kopräzipitation mit IgM auf die Radioaktivität im Präzipitat von WEHI22-Lysat zeigt Tab. 20.

Tabelle 20: Einfluß einer Vorpräzipitation mit K αNMS-Antiserum/NMS auf die Präzipitation unterschiedlich lysierter T-Lymphomzellen (WEHI 22) mit Hü αμ-AK/K αHüIg-AS und Staph. A. sowie IgM p.c.

	Präzipitate[x] von radiojodierten WEHI 22-Zellen lysiert mit:			
	0.1 % Triton X-100 ($1x10^6$ cpm/100 µl)		0.1 % Triton X-100 10 M Harnstoff 0.5 M Essigsäure ($2x10^6$ cpm/100 µl)	
Kopräzipitiert mit	Ø (cpm)	MIgM (cpm)	Ø (cpm)	MIgM (cpm)
ohne Vorpräzipitation				
Exp. 1	62 000	61 200	395 000	384 000
Exp. 2	58 800	60 000	380 000	353 000
Exp. 3	-	66 400	-	408 000
mit Vorpräzipitation[xx]				
Exp. 1	5 600	13 500	99 000	74 400
Exp. 2	12 400	9 900	77 200	82 000

x) Präzipitation von 100 µl Zell-Lysat mit 15 µl Hühner αμ-AK (2 mg/ml) ± 10 µl Maus IgM p.c. (1 mg/ml), 100 µl Kaninchen α Hühner Ig-AS und 100 µl Staph. A.-Suspension (10 %)

xx) Vorpräzipitation von je 100 µl Zell-Lysat mit 5 µl Normalem Maus Serum (1:10 verd.) und 50 µl Kaninchen α Normales Maus Serum-AS (absorbiert mit Maus IgM)

Nach Lyse der radiojodierten Lymphozyten mit Essigsäure/Harnstoff/Triton war im Präzipitat die 6-fache Aktivität im Vergleich zu Präzipitaten nach Lyse mit Triton X-100 allein zu

finden. Diese Steigerung der präzipitierten Aktivität um den Faktor 6 zeigte sich sowohl in den Proben ohne Vorpräzipitation als auch in den Immunpräzipitaten mit Vorpräzipitation. Die Zugabe von IgM hatte keinen Einfluß auf die Menge der präzipitierten Proteine.

Die vergleichende Analyse der Präzipitate aus 0.1 % Triton X-100-Lysaten und 0.1 % Triton X-100/10 M Harnstoff/0.5 M Essigsäure-Lysaten in SDS-Disc-Gelen zeigte keine wesentliche Anreicherung der präzipitierten schweren und leichten Ig-Ketten (siehe III, 6.3.).

Der Einfluß der Vorpräzipitation dagegen war erheblich. In einem Teil der Proben waren im Gel überhaupt keine Banden mehr nachzuweisen. Die Präzipitate mit erhaltenen schweren Ketten-Banden zeigten eine starke Verringerung bis zu völligem Verschwinden der 35-45 000 d-Bande (siehe III, 6.3.2.1., Abb. 29). Auch die Menge an leichten Ketten war deutlich verringert.

Zusammenfassend zeigt Tab. 21 die Radioaktivität der Immunpräzipitate der einzelnen Hühner αμ- und Fdμ-Antikörper mit den Lysaten verschiedener radiojodierter Maus-Lymphozytenpopulationen. Die relativ hohe Aktivität der Hü αKLH-AK-Präzipitate erklärt den in der Analyse mit SDS-Disc-PAGE auftretenden hohen Background und die relativ geringen Peak-Höhen der präzipitierten schweren und leichten Ketten im Verhältnis zu "unspezifisch" präzipitierten Aktivitäten. Da der Hauptteil der Präzipitat-Aktivität mit dem Bromphenolblau-Marker in der Gelelektrophorese wandert, muß die proteolytische Degradation eines beachtlichen Teils der präzipitierten Strukturen angenommen werden. Die Zugabe des Proteaseninhibitors PMSF zum Lysepuffer hatte aber keinen Einfluß auf die Menge an niedermolekular assoziierter Aktivität. Deshalb scheint auch die nicht-kovalente Adsorption größerer Mengen von I-125 an die Immunkomplexe möglich.

Tabelle 21: Immunpräzipitation radiojodierter Zelloberflächen-Proteine verschiedener Maus-Lymphozyten-Populationen mit affinitätschromatographisch gereinigten Hühner-Anti-μ- und Anti-Fdμ-Antikörpern

	periphere T-Zellen	Thymus-Zellen	B-Lymphozyten (Milzzellen von nu/nu Mäusen)	MLC Blasten[b]	WEHI 22 T-Lymphom-Zellen
			(cpm x 10^3)		
Hüαμ	230±60[a]	179± 3	176± 6	21.2± 3.2	61.2± 6
abs. Mauserythrozyten					
Schaferythrozyten					
BCG					
P815	39± 1[c]	-	178±17[c]	-	10.3± 3.4[c]
$Hüαμ_{ox}$	125	138± 2	95± 3	25 ± 6	49 ± 8
abs. Erythrozyten					26 ± 5.5
Hüαμ-Ketten	190±70	160±45	115±40	54 ± 7	64 ± 8
abs. Erythrozyten					30 ± 6
$HüαFd26000_{ox}$	133±40	153±25	128±21	28 ± 4	59 ± 6
abs. Erythrozyten					11 ± 3.1
HüαFd44000	157±41	158±10	121±11	28.2± 5.2	67 ± 3
abs. Erythrozyten					19.8± 4.2
HüαKLH	122±40	140±15	130±20	14.3± 4	44 ± 1
abs. Erythrozyten	22± 5[c]				6 ± 2[c]

a) Mittelwert aus 2 bis 6 Präzipitationen ± Standardabweichung
b) ohne Staph. A. copräzipitiert
c) mit Vorpräzipitation

6.3. Analyse der Immun-Präzipitate mit Hilfe der SDS-Disc-PAGE

Die Auftrennung der präzipitierten, radiojodierten Zelloberflächenstrukturen nach der Größe in SDS enthaltenden Polyacrylamid-Gelen ergab nach dem Schneiden der Röhrchengele und der Bestimmung der Aktivität der Gel-Fraktionen im γ-Zähler folgende Muster.

6.3.1. Analyse der Präzipitate von Maus-B-Zellen mit Hühner αIgM p.c.-Antiserum und Hühner αμ-Antikörpern in 10 % Polyacrylamidgelen unter reduzierenden Bedingungen

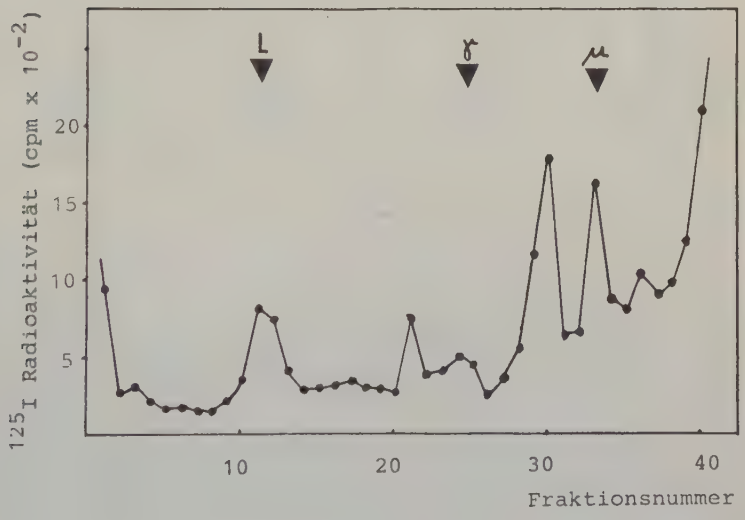


Abb. 26: Milzzellen-Lysat, präzipitiert mit Hü αIgM p.c.-Antiserum ohne Absorptionen

Die Analyse der Präzipitate von Hü αIgM p.c.-Antiserum und gereinigten Hü αμ-Antikörpern mit B-Zell-Lysaten unter reduzierenden Bedingungen ergab im wesentlichen vier Banden. Dieses Muster mit Banden von 75 000 d (μ-Kette = schwere Kette des IgM), 68-70 000 d (δ-Kette = schwere Kette des IgD) und von ca. 25 000 d (leichte Ketten der Ig).

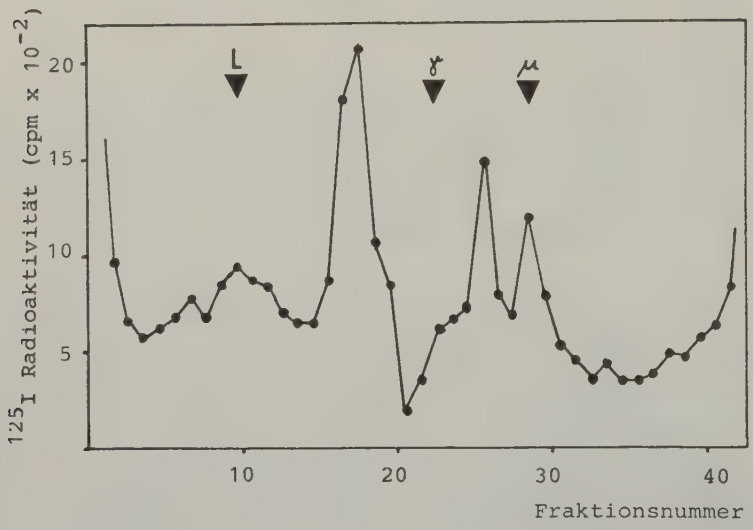


Abb. 27: B-Lymphozyten-Lysat präzipitiert mit gereinigten, Anti-μ-spezifischen Antikörpern ausErythrozytenund P815 absorbiertem Hü αIgM p.c.-Antiserum in 10 % Polyacrylamidgelen unter reduzierenden Bedingungen.

Die verwendeten B-Zellen wurden aus der Milz von nackten Mäusen gewonnen, die auf Grund verschiedener genetischer Defekte keinen Thymus besitzen. Die Milzzellen dieser nu/nu Mäuse (Balb/c) enthalten keine differenzierten T-Zellen.

Diese apparenten Molekulargewichte entsprechen den bekannten Oberflächen-Immunglobulinen reifer B-Lymphozyten (31,130,131). Da das Hü αIgM p.c.-Antiserum in ID-Tests nach Ouchterlony

Reaktivität gegen IgM und IgG zeigte, ist eine weitere Kreuzreaktivität mit IgD auf B-Lymphozyten denkbar. Auch die affinitätschromatographisch gereinigten spezifischen Hü αμ-AK vermögen noch δ-Ketten zu präzipitieren. Auf Grund der absichtlich gewählten großen phyllogenetischen Distanz zwischen Huhn und Maus war eine Kreuzreaktion der Hühner-Anti-IgM-Antikörper mit Membran-gebundenem IgD zu erwarten. Für diese These spricht die Existenz der kreuzreagierenden Determinanten auf IgM und IgD, die auf IgG nicht vorhanden sind.
Bei 35 000 - 45 000 d apparentem Molekulargewicht tritt eine zusätzliche Bande auf, die in Präzipitaten mit komplettem Hühner-Antiserum wenig ausgeprägt ist, jedoch bei Verwendung von gereinigten Hühner-Antikörpern bis zu 50 % der im Gel aufgetrennten Radioaktivität enthält.

6.3.2. Analyse der Präzipitate verschiedener Populationen von Maus-T-Lymphozyten mit gereinigten Hühner Anti-μ-Antikörpern

Auf den über Nylonwolle gereinigten, peripheren T-Lymphozyten fanden sich neben der "unspezifischen" 35 - 45 000 d-Bande noch zwei weitere Banden (Abb. 28).
Nach Vorpräzipitation mit Kaninchen αNMS-Antiserum und NMS war nur noch eine Bande zu finden, wie aus Abb. 29 ersichtlich ist. Es handelt sich um eine im Bereich der leichten Ketten von Maus-Ig wandernde Bande und eine schwere Kette mit einer Mobilität, die zwischen der von δ- und μ-Ketten der Oberflächen-Immunglobuline von B-Lymphozyten lag. Die deutlich größere Beweglichkeit der gefundenen schweren Kette unterscheidet die schweren Ketten von den μ-Ketten aus der Oberfläche von B-Lymphozyten.
Diese Mobilitätsdifferenz erlaubt auch eine Abgrenzung gegen zytophil adsorbiertes Serum-IgM. Um diesen geringen Mobilitätsunterschied experimentell weiter zu sichern, wurde im gleichen Gel I-131 markiertes IgM mit aufgetrennt.

Wie aus Abb. 30 eindeutig hervorgeht, zeigte sich ein geringer, aber signifikanter Unterschied in der Beweglichkeit beider schweren Ketten.

6.3.2.1. Präzipitate von Lysaten aus peripheren T-Lymphozyten

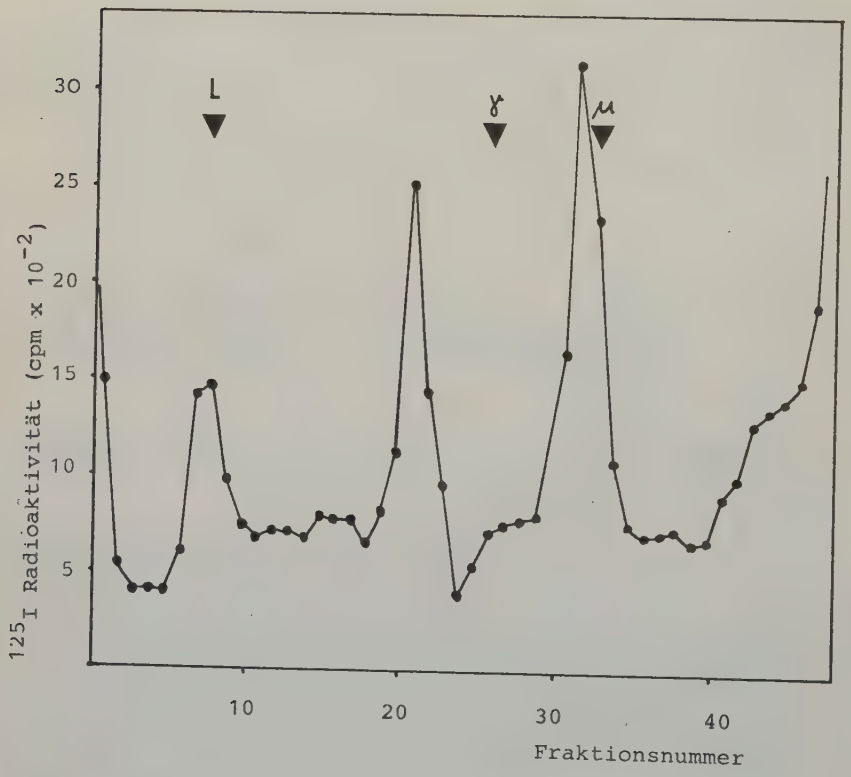


Abb. 28: Lysate peripherer T-Lymphozyten präzipitiert mit Hü αμ-AK, die nebenErythrozytenund P815-Zellen auch mit BCG absorbiert wurden
- ohne Vorpräzipitation

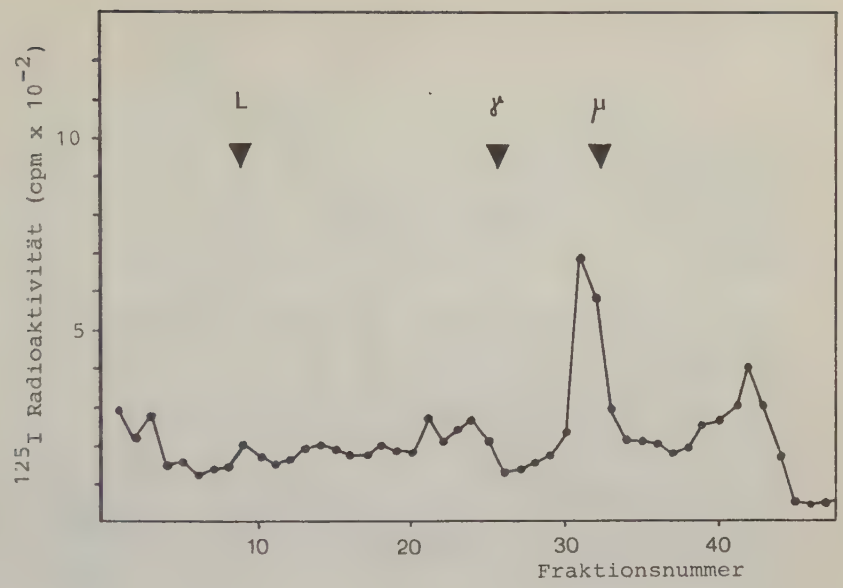


Abb. 29: Lysate peripherer T-Lymphozyten präzipitiert mit Hü αμ-AK, die neben Erythrozyten und P815-Zellen auch mit BCG absorbiert wurden
- mit Vorpräzipitation

Da I-131 neben dem Hauptemmissionsgipfel bei 364 KeV (80 %) noch einen Gipfel bei 32 KeV besitzt, und der Haupt-γ-Emmissionsgipfel von I-125 bei 35 KeV liegt, werden bei der Zählung der doppelt markierten Probe im I-125-Kanal auch Impulse des I-131-Markers mitgezählt (Überstrahlung). Sie wurden nach der Bestimmung des Überstrahlungs-Anteils der I-131-Aktivität rechnerisch eliminiert.
Wie in Abb. 28 dargestellt, zeigt das Profil des Präzipitats eine Bande mit hoher Aktivität im 35 - 45 000 d-Bereich. Zur Klärung der Frage, ob es sich um spezifisch präzipitierte, degradierte Rezeptormoleküle oder um andere Moleküle, z.B. um unspezifisch präzipitiertes Aktin handelt, das mit dem Ig-Komplex assoziiert ist, wurden Vorpräzipitationen durch-

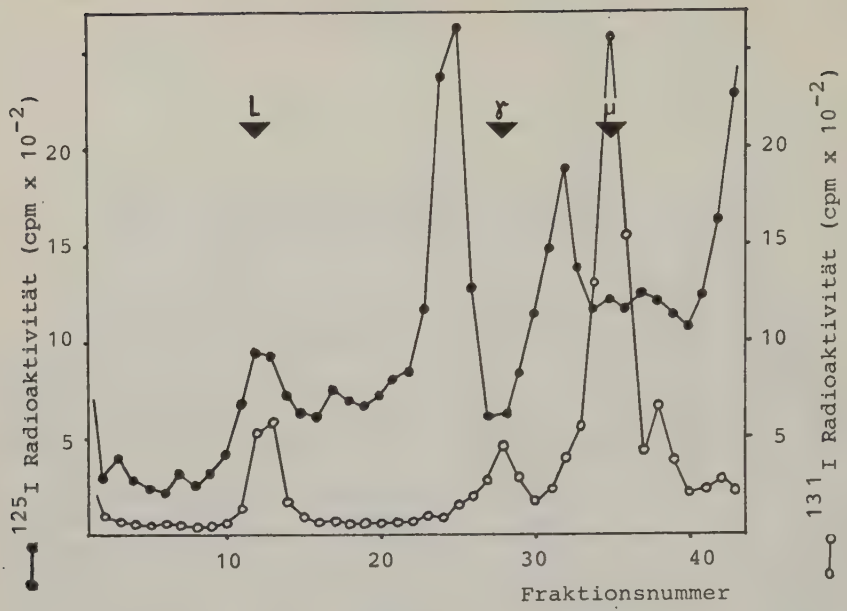


Abb. 30: Analyse von Präzipitaten aus Lysaten I-125 markierter peripherer T-Zellen mit Hü αμ-Antikörpern und von I-131 markiertem Maus-IgM und IgG im gleichen Gel als interner Marker

geführt. Die durch Kaninchen-Anti-Maus-Serum-Antiserum und NMS gebildeten Komplexe sollten alle Komponenten des Zell-Lysates absorbieren, die an Immunkomplexe binden können. Nach Vorpräzipitation (vgl. Tab. 20 und 21) wird im spezifischen Präzipitationsschritt die präzipitierbare Radioaktivität um ca. 80 % reduziert.

Wie Abb. 29 zeigt, wird der 35 - 45 000 d-Gipfel durch die Vorpräzipitation fast vollständig eliminiert. Allerdings reduziert sich auch die 70 000 d-Bande auf die Hälfte, während die 25 000 d-Bande auf Untergrundniveau gedrückt wurde. Da nach Vorpräzipitation häufig keine eindeutigen Gelbanden mehr zu finden waren, wurde auf die Vorpräzipitation als Standardmethode verzichtet.

Die überproportionale Reduktion des 35 - 45 000 d-Gipfels durch Vorpräzipitation im Vergleich zum 70 000 d-Gipfel kann als Hinweis auf eine unspezifische Kopräzipitation dieser Komponente gelten.
Trotz der hohen Radioaktivität in den Kontrollpräzipitaten mit Hühner-Anti KLH-Antikörpern aus Lysaten von peripheren T-Zellen fanden sich im Gel keine spezifischen Präzipitatbanden außer den geringen Mengen an 35 - 45 000 d-Molekülen (siehe 6.3.2.3.).
Die sehr hohe Aktivität der Hü αKLH-Präzipitate mit allen verwendeten Zellpopulationen (siehe Tab. 5) verteilte sich gleichmäßig auf eine hohe Untergrundaktivität und auf die mit der Pufferfront migrierende Radioaktivität. Aus diesen Gründen wurde in allen gezeigten Profilen die Untergrundaktivität der unspezifischen Hü αKLH-AK-Präzipitate von den spezifischen Präzipitaten subtrahiert.

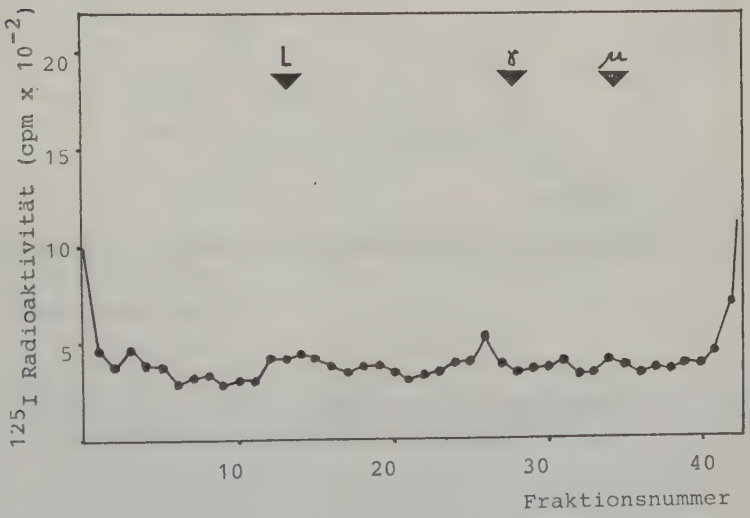


Abb. 31: Kontrollpräzipitat aus Lysaten von peripheren T-Zellen mit Hü αKLH-AK

6.3.2.2. Präzipitate aus Thymozyten-Lysaten

Aus Thymozyten-Lysaten wurden die gleichen schweren Ketten (70 000 d) und leichten Ketten (25 000 d) mit Hü αμ-AK präzipitiert (Abb. 32). Zusätzlich zeigte sich ein Molekül von etwa 130 - 140 000 d.
Auffallend ist die relativ hohe Radioaktivität im L-Kettenbereich im Vergleich zur Bande der schweren Ketten.

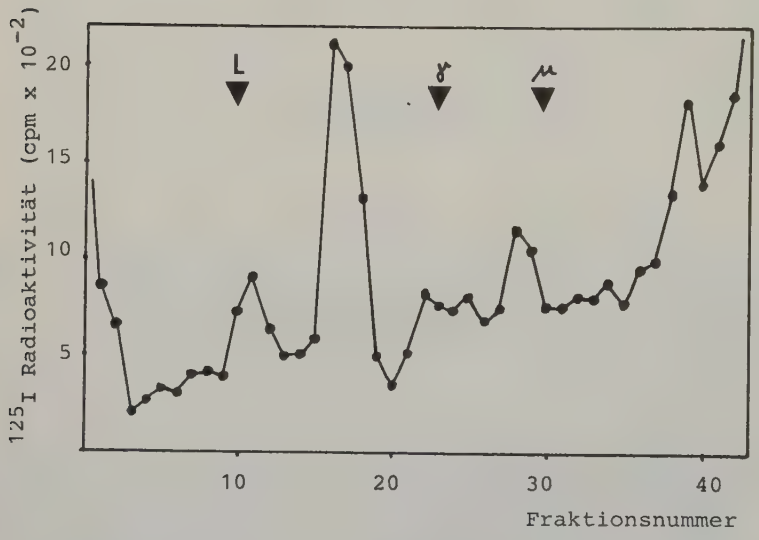


Abb. 32: Thymuszellen-Lysate präzipitiert mit Hü αμ-AK

6.3.2.3. Präzipitate aus Lysaten von T-Lymphom-Zellen WEHI 22

Aus Lysaten von T-Lymphom-Zellen WEHI 22 wurden mit den Hü-αμ-AK ebenfalls 70 000 d- und 25 000 d-Moleküle präzipitiert (Abb. 33). Diese WEHI 22 Linie wurde in vitro gezüchtet, d.h. sie kam nie mit Serum-Immunglobulinen der Maus in Berührung. Deshalb kann bei diesen Zellen die Adsorption von Serum-Ig via Fc-Rezeptoren ausgeschlossen werden.

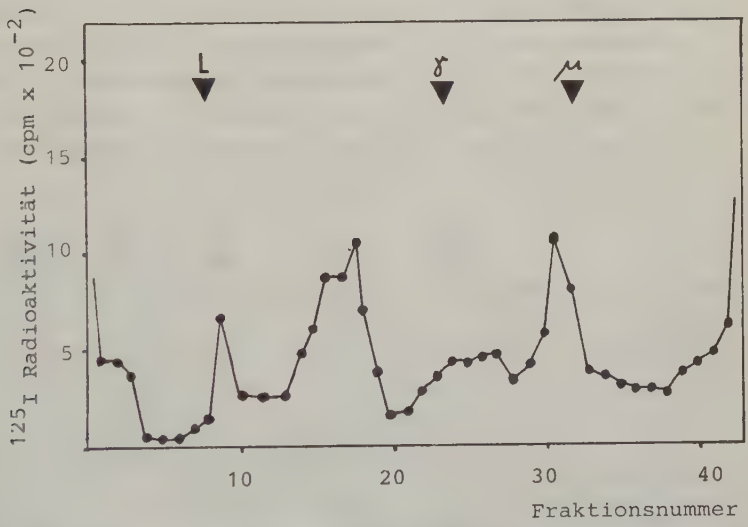


Abb. 33: WEHI 22 T-Lymphom-Zellen-Lysate präzipitiert mit Hü αμ-AK

6.3.2.4. Präzipitate aus MLC-Blasten-Lysaten

Aus MLC-Blasten-Lysaten konnten die gleichen 25 000 d- und 70 000 d-Moleküle präzipitiert werden und zwar sowohl mit Hü αμ-AK, die aus absorbiertem Hü αIgM p.c.-AS präpariert wurden, als auch mit affinitätschromatographisch gereinigten Hühner-Antikörpern gegen isolierte, Perjodat-oxidierte μ-Ketten aus IgM p.c.

Um spezifisch reagierende T-Lymphozyten anzureichern, wurden in einer Lymphozyten-Mischkultur (MLC) T-Blasten induziert. Die über einen BSA-Gradienten durch 1 g Sedimentation isolierten Blasten stellen eine Population von Zellen dar, die durch Alloantigen-Stimulation zur Proliferation gebracht wurden. Die MLC-Blasten bestehen überwiegend aus T-Lymphozyten, die allerdings auf ihrer Oberfläche auch B-Zell IgM in Form eines Komplexes mit dem Alloantigen der Stimulatorzellen tragen können (137).
Die Schulter des 70 000 d-Gipfels (Abb. 34) ist u.U. auf ein derart gebundenes Serum-IgM zurückzuführen. Zusätzlich ist in Abb. 34 wieder der Gipfel bei einem apparenten Molekulargewicht von 130 - 140 000 d zu beobachten.

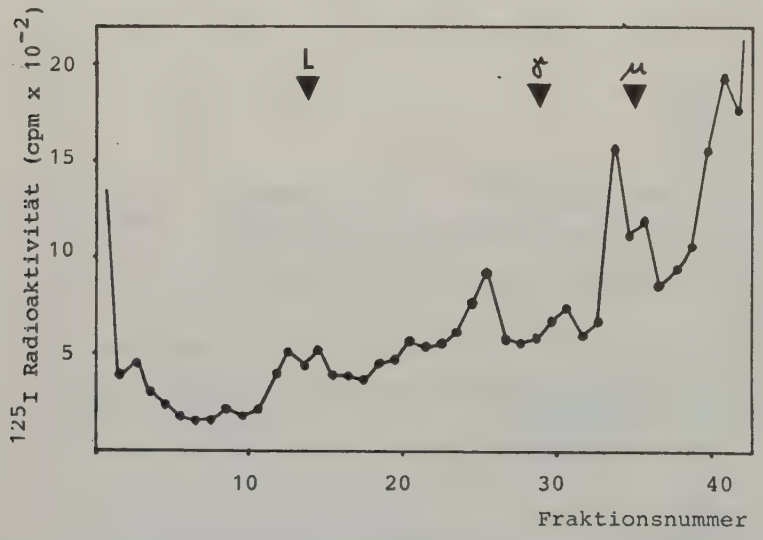


Abb. 34: MLC-Blasten-Lysate präzipitiert mit Hühner-Antiserum gegen gereinigte und oxidierte μ-Ketten

6.3.3. Analyse der Präzipitate verschiedener Maus-T-Lymphozyten Populationen mit gereinigten Antikörpern gegen isolierte, Perjodat-oxidierte Fdμ26000-Fragmente

Für die Untersuchung des Antigen-Rezeptors auf T-Zellen sollten auch Antikörper eingesetzt werden, die präferentiell mit Determinanten des variablen Teils der schweren Kette des IgM reagieren. Zu diesem Zweck wurden Antikörper gegen das 26 000 d Fdμ-Fragment der schweren Kette induziert; dessen Kohlenhydratanteile oxidativ entfernt worden waren.
Nach Isolierung der AK an insolubilisiertem IgM wurden diese zur Präzipitation von radiojodierten Oberflächenmolekülen verschiedener Maus-Lymphozyten-Populationen eingesetzt.

6.3.3.1. Präzipitate von Lysaten radiojodierter B-Lymphozyten

Mit dem oben genannten Anti-Fdμ-Antikörper wurden aus Lysaten von B-Lymphozyten μ- und δ-Ketten sowie L-Ketten präzipitiert. Zusätzlich trat das in III, 6.3.1. schon näher diskutierte 35 - 45 000 d-Molekül auf.

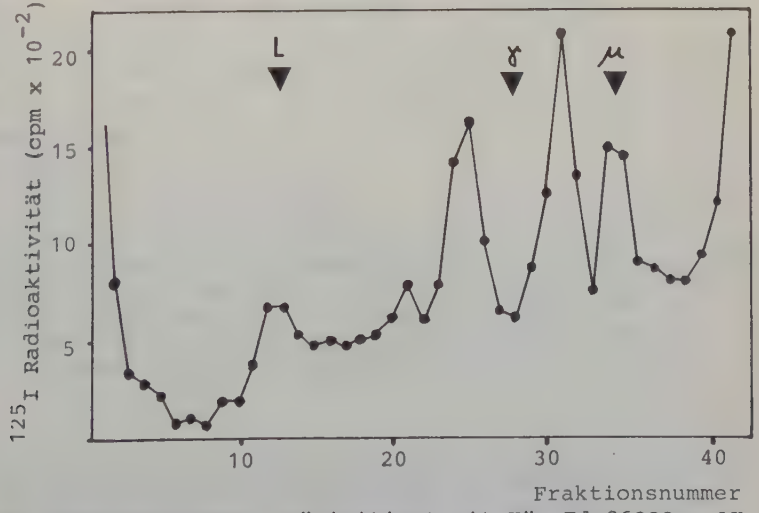


Abb. 35: B-Zellen-Lysate präzipitiert mit Hü αFdμ26000$_{ox}$ AK. Als B-Lymphozyten wurden Milzzellen aus nackten Mäusen verwendet.

6.3.3.2. Analyse der T-Lymphozyten-Lysate

Sowohl bei peripheren T-Zellen (Abb. 36) als auch bei Thymozyten (Abb. 37), MLC-Blasten (Abb. 38) wie bei WEHI 22 T-Lymphom-Zellen (Abb. 39) präzipitierten die Hü $\alpha Fd\mu 26000_{ox}$-Antikörper jeweils eine schwere Kette mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 70 000 d sowie eine leichte Kette mit etwa 25 000 d. Auch in diesen Präzipitaten zeigte sich die Komponente mit 35 - 45 000 d besonders ausgeprägt im Präzipitat von peripheren T-Zellen.

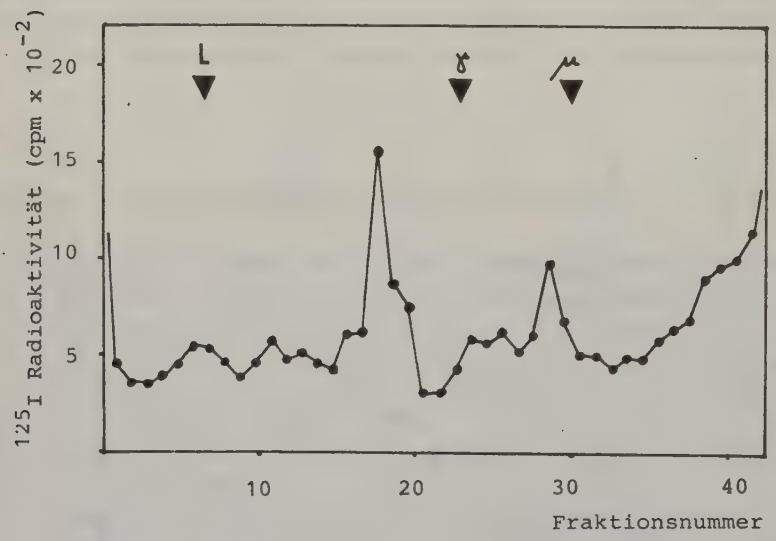


Abb. 36: Periphere T-Zellen-Lysate präzipitiert mit Hü α-$Fd\mu 26000_{ox}$-Antikörpern, die zusätzlich mit BCG und P815-Zellen absorbiert waren. Das Präzipitat-Muster war identisch bei Verwendung von Antikörpern, die nur mit Schaferythrozyten absorbiert waren.

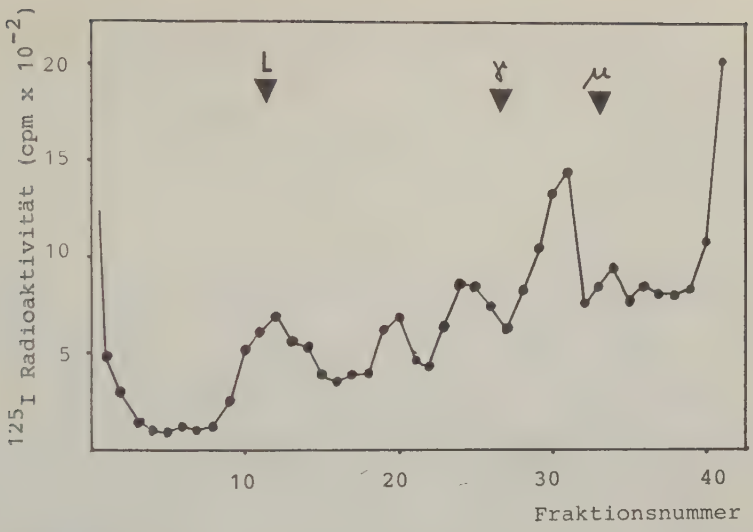


Abb. 37: Thymus-Zellen-Lysate präzipitiert mit Hü α-Fdμ26000$_{ox}$-Antikörpern, die zusätzlich mit BCG und P815-Zellen absorbiert waren.

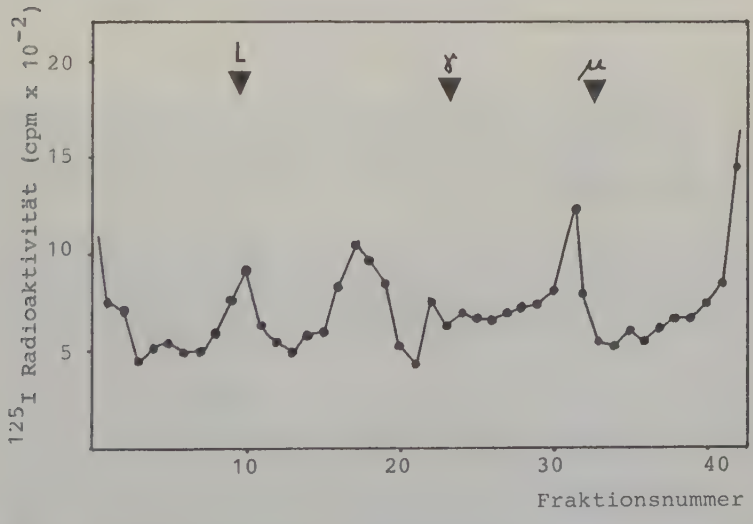


Abb. 38: WEHI 22-T-Lymphom-Zellen-Lysate präzipitiert mit Hühner αFdμ26000$_{ox}$ Antikörpern, zusätzlich absorbiert mit P815-Mastozytom-Zellen und BCG .

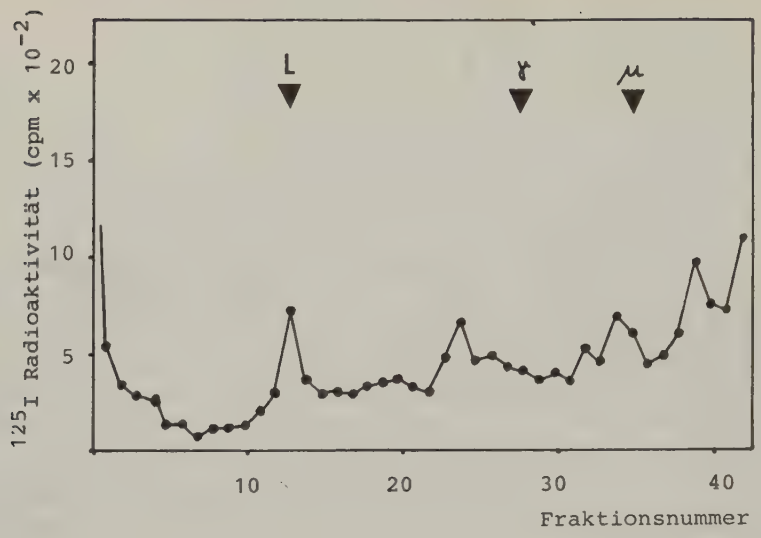


Abb. 39: MLC-Blasten-Lysate präzipitiert mit Hü αFdμ26000$_{ox}$-Antiserum

6.3.4. Analyse der Immunpräzipitate von Lysaten peripherer T-Zellen in SDS-Disc-Gelen unter nicht-reduzierenden Bedingungen

Zur Analyse des Molekulargewichts des intakten Moleküls wurden die Präzipitate aus T-Zellen-Lysat mit Hü αμ-AK auch unter nichtreduzierenden Bedingungen in 10 % und 7.5 %-Polyacrylamidgelen aufgetrennt.
In den 10 %- und 7.5 %-Gelen trat überwiegend ein Molekül mit einer geringeren Mobilität als Maus-IgG auf, was einem apparenten Molekulargewicht von 130 - 140 000 d entspricht. Im 10 %-Gel trat wie unter reduzierenden Bedingungen eine zusätzliche Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 35 - 45 000 d auf. Daneben finden sich wechselnde Men-

gen schwerer Ketten (70 000 d) und L-Ketten aus Serum Immunglobulinen. Im 10 %-Gel (Abb. 40a) fanden sich nur sehr geringe Mengen dieser 70 000 d und 25 000 d-Moleküle, während das 7.5 %-Gel (Abb. 40 b) eine größere Radioaktivitätsmenge im 70 000 d-Bereich zeigte. Hier handelt es sich möglicherweise um ein Dissoziationsprodukt des 130 - 140 000 d-Moleküls.

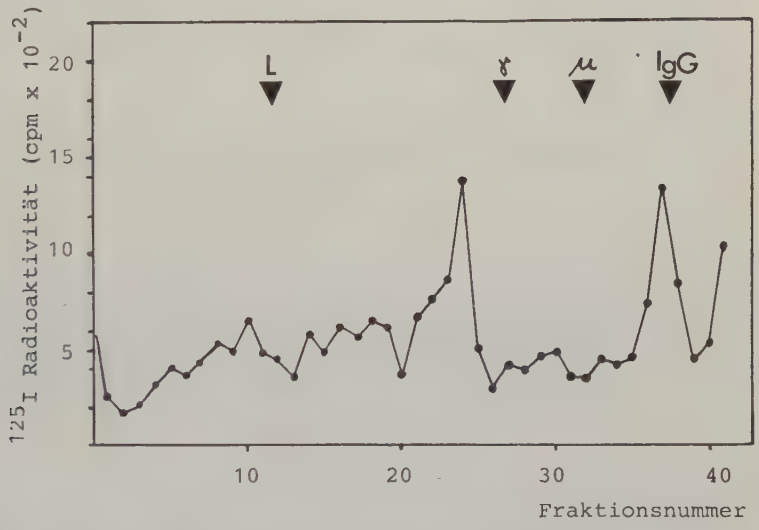


Abb. 40a: Periphere T-Zellen-Lysate präzipitiert mit Hühner αμ-Antikörpern. Analyse im 10 %-Gel, nicht reduziert.

Die Pfeile zeigen die Mobilität von radiojodierten Markerproteinen in parallel gelaufenen Röhrchengelen. Das F(ab')$_2$-Fragment von Maus-IgG besitzt ein MG von 100 000 d, Maus-IgG ein MG von 150 000 d.

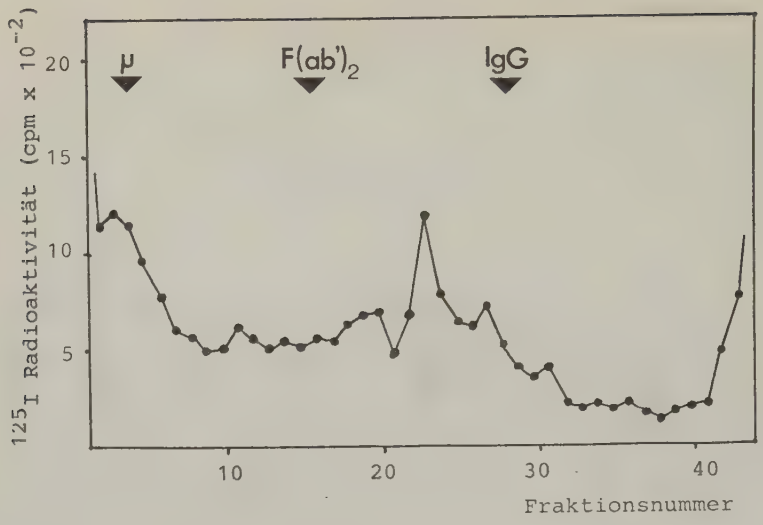


Abb. 4Ob: Periphere T-Zellen-Lysate präzipitiert mit Hühner αμ-Antikörpern, Analyse im 7.5 %-Gel, nicht reduziert.

Die Pfeile zeigen die Mobilität von radiojodierten Markerproteinen in parallel gelaufenen Röhrchengelen. Das Maus IgG besitzt ein MG von 150 000 d.

7. Versuche zur Inhibition der gemischten Lymphozytenkultur (MLC) mit Hühner- und Kaninchen-Antiseren

Nachdem die Bindung von Hphner αμ-Antikörpern auf T-Zellen in der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen wurde und in der Immunpräzipitationsanalyse ein Membranprotein mit einer definierten 70 000 d großen Komponente identifiziert werden konnte, sollten die charakterisierten αμ-Antikörper zur Inhibition spezifischer Funktionen von T-Zellen eingesetzt werden.

In der MLC wird die Fähigkeit der T-Lymphozyten, Alloantigene auf anderen Zellen zu erkennen, getestet. Als Folge der Antigenerkennung proliferieren primär die kompetenten T-Lympho-

zyten. Als Maß für die Proliferation wird der Einbau von ^{3}H-Thymidin bestimmt. Eine der durch Alloantigene stimulierten T-Zell-Subpopulationen, die sog. Ly-2,3 positiven Zellen (153), entwickeln sich im Laufe der MLC zu zytotoxischen Effektorzellen. Sie können die MLC-Stimulatorzellen in einer spezifischen Reaktion lysieren.
Mit den definierten Anti-μ-Reagentien sollte nun versucht werden, sowohl die MLC als Modell für die primäre Antigenerkennung als auch die CML (siehe III, 8.) als Modell einer Antigenerkennung auf der Ebene der Effektorphase zu inhibieren.
Im Sinne dieser Arbeitshypothese sollten durch Vorinkubation der T-Lymphozyten mit Hühner αμ-Antikörpern die Antigenrezeptoren blockiert werden.

7.1. Effekt von Hühner-Anti-IgM-Antiserum und daraus gereinigter, μ-spezifischer Antikörper auf die MLC (C57bl → DBA)

Vorinkubation der C57/bl Responder-Milzzellen mit Hühner αIgM-Antiserum (Tab. 22a) führte zu einer drastischen Verringerung der Stimulation in der 72-Stunden MLC. Obwohl das Antiserum nur während der 30-minütigen Vorinkubation einwirkte und die Responder-Zellen danach gewaschen wurden, reichten die adsorbierten AK offenbar aus, die Allo-Antigenerkennung und die daraus resultierende Proliferation weitgehend zu verhindern.
Die beobachtete Inhibition mit Hü αIgM-AS von etwa 75 % (siehe Tab. 22a) trat nicht bei den getesteten Kontrollseren gegen κ-leichte Ketten oder gegen Rinderserumalbumin auf.
Bei Vorinkubation mit Prä-Immunseren und Normalem Hühnerserum zeigten sich Schwankungen des ^{3}H-Thymidin-Einbaus in einzelnen MLC-Ansätzen von 20 % bis 150 % des Einbaus verglichen mit MLC-Ansätzen ohne Vorinkubation mit Präimmunserum.
Die Vorinkubation der Responderzellen in MLC-Medium hatte

Tabelle 22a: Inhibition der MLC (c57/Bl → DBA) durch Hühner-Anti-Maus-Immunglobulin-Antiseren bzw. Antikörper

Antiserum/Antikörper	% Inhibition[x)]
Hü αIgM p.c.-AS	74 ± 5 (7)[xx)]
Hü αIgM p.c.-AS (absorbiert mit MIgG)	81 ± 3 (2)
Hü αIgM p.c.-affichrom AK	72 ± 23 (3)
Hü $\alpha\mu_{isoliert}$-AS	74 ± 21 (3)
Kontrollen	
Hü ακ(MOPC 21)-AS	6 ± 5 (3)
Hü αRSA-AS	10 ± 17 (3)

x) Inhibition bezogen auf Stimulation nach Präinkubation der Responder-Zellen mit Prä-Immunserum oder gepooltem Normalem Hühnerserum bzw. normalem Hühner Ig (Cohn II-Fraktion)

xx) Prozentsatz der Inhibition ± Standardabweichung. Die Zahl in Klammern gibt die Zahl der unabhängigen Einzelexperimente wieder.

Tabelle 22b: Inhibition der MLC durch verschiedene Konzentrationen von Hühner αIgM-Antiserum

Verdünnung des AS bei Vorinkubation	% Inhibition der MLC
1:2	77 ± 17 (4)
1:4	74 ± 5 (7)
1:10	68 ± 8 (2)

keinen Einfluß auf ihre MLC-Reaktivität. Für die Inhibitions-Versuche wurden nur solche MLC-Experimente ausgewertet, deren ^{3}H-Thymidin-Einbau bei Vorinkubation mit Präimmunseren > 60 % und < 120 % des Kontroll-Einbaus (ohne Vorinkubation) betrug.

Die Höhe der gefundenen Inhibition der MLC-Stimulation wurde bis zu einer Verdünnung des Hühner-Antiserums von 1:10 im Vorinkubationsansatz nicht beeinflußt (Tab. 22b). Vorversuche zur Inhibition der MLC mit affinitätschromatographisch gereinigten Hühner-Antikörpern gegen Maus-IgG und das $F(ab')_2$-Fragment von Maus-IgG zeigten statt Inhibition wie im Falle der Hü αMaus IgM p.c.-Antikörper eine Steigerung des ^3H-Thymidin-Einbaus bis zum Fünffachen der normalen Stimulation ohne Responder-Vorinkubation.

8. Versuche zur Inhibition der zellvermittelten Zytotoxizität (CMC) mit Hühner Anti-μ- und Anti Fdμ-Antikörpern

Antikörper gegen Determinanten der konstanten Regionen von Immunglobulinen können die Antigenbindung von B-Lymphozyten blockieren (124). Wenn am Aufbau der T-Zell-Rezeptoren analoge Strukturen der konstanten oder variablen Regionen von Ig beteiligt sind, sollten AK gegen solche Determinanten über die reine Bindung hinaus auch die Effektorfunktionen von T-Zellen beeinflussen können.
Es war zu untersuchen, ob durch Vorinkubation der MLC-induzierten zytolytischen T-Lymphozyten mit Hühner Anti μ-Antiseren bzw. daraus gereinigten Antiköprern zytolytische Funktionen blockiert wurden.
Dazu wurden 2-8 x 10^5 MLC-induzierte zytotoxische Zellen in 20 μl mit 20 μl Hühner αIgM-AS oder Hü αμ-AK (2 mg/ml) 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Verdünnung auf 200 μl wurden zu je 100 μl Zellsuspension je 10^4 chromierte Zielzellen zugegeben. Nach 4 Stunden bei 37°C wurde die Cr-51 Freisetzung als Maß für die Lyse der Zielzellen bestimmt.
Im einzelnen waren folgende Meßwerte bzw. CMC-Ansätze notwendig:

1. Die spontane Freisetzung von Cr-51.
   Hierbei wurden 1 x 10^4 chromierte Zielzellen mit 0.2 ml Medium inkubiert. Normalerweise lagen die Werte unter 10 % der eingebauten Aktivität.

2. Die maximale Freisetzung.
   1×10^4 chromierte Zielzellen wurden 3 mal bei $-20^{\circ}C$ eingefroren und bei $+37^{\circ}C$ im Brutschrank wieder aufgetaut. Dabei wurden meist über 80 % des eingesetzten Chromats-51 in den Überstand abgegeben. Der Rest blieb an zentrifugierbare Zellfragmente gebunden.

3. Die Zytotoxizität "normaler" Milzzellen.
   Hierfür wurden 1×10^4 chromierte P815-Zielzellen mit normalen C57Bl-Milzzellen inkubiert. Die Zahl der eingesetzten normalen Milzzellen entsprach der Zahl der eingesetzten zytotoxischen Zellen und lag im Bereich von 1 bis 4×10^6 Zellen. Die Werte der Cr-51-Freisetzung lagen hier immer unter 10 % des Cr-51-Einbaus.

4. Die Zytotoxizität "immuner" Milzzellen.
   1×10^4 chromierte Zielzellen wurden mit unterschiedlichen Mengen von MLC-generierten zytotoxischen Zellen inkubiert. Als Ausgangswert für die inhibitorische Aktivität der Anti-μ-Antikörper wurde ein Effektor/Zielzellen-Verhältnis gewählt, mit dem ungefähr 50 % der maximal möglichen Zytolyse erzielt wurde. Diese Voraussetzung muß erfüllt sein, da bei einem Überschuß an zytotoxischen Zellen (Plateau des Cr-51-Release) die Inhibition eines Teils dieser Zellen keinen Effekt auf den gemessenen Gesamt-Release zeigen würde.

5. Effekt der Kontrollseren auf die Zytotoxizität "immuner" Milzzellen.
   Für diese Kontrolle wurden 1.5×10^6 Effektorzellen statt mit Anti-IgM-Antiseren entweder mit dem entsprechenden individuellen Präimmunserum oder mit einem Immunserum anderer Spezifität (Hü αKLH-AS) inkubiert. Als Kontrollen für gereinigte Hü αμ-Antikörper dienten entweder "normales" Hühner-Immunglobulin oder isolierte Hühner αKLH-Antikörper. Diese Vorinkubation der zytotoxischen Zellen erniedrigte die Cr-51-Freisetzung bis auf 80 % der spezifischen Zytotoxizität mit nichtvorinkubierten "immunen" Milzzellen. In einzelnen Experimenten wurden auch stärkere Inhibi-

tionseffekte beobachtet. Die Vorinkubation der Effektorzellen in CML-Medium hatte keinen Einfluß auf ihre Zytotoxizität.
Bei der Berechnung der Inhibition durch αIgM-AS oder -AK diente der spezifische Release dieser Kontroll-Ansätze als Bezugswert (0 % Inhibition).

8.1. Effekt von Hühner Anti IgM-Antiserum und daraus affinitätschromatographisch gereinigten Antikörpern

Hühner-Anti IgM p.c.-Antiserum inhibierte zu etwa 58 % die spezifische Zytotoxizität der alloreaktiven T-Lymphozyten (siehe Tab. 24) bezogen auf Präimmunserum.

Tabelle 24: Inhibition der CMC mit Hühner Anti Igm p.c.-Antiserum und daraus isolierten spezifischen Anti-μ-Antikörpern

	% Inhibition der spezifischen Zytotoxizität[x)]			
	Antiserum absorbiert mit:		affinitätschromatographisch gereinigter AK	
Spezifität	Ø	Erythrozyten	Ø	Erythrozyten
Hü αIgM p.c.	58 ± 20(5)	48 ± 6(2)	91 ± 4(3)	-
Hü αμ	-	-	-	27 ± 14(3)
				39 ± 13(3)[xx)]
Hü αMIgG	23 ± 8(3)	-	11 ± 4(4)	10(1)
Hü αMκ-Kette	22 ± 5(2)	-	26 ± 14(2)	-
Normales Hü-Ig	-	-	5 ± 4(3)	0(2)

x) Die Inhibition der spezifischen Zytotoxizität wurde auf die spezifische Zytotoxizität bei Inkubation mit Präimmunseren bezogen. Die Inhibition durch das getestete Hü αKLH-Antiserum bzw. die daraus gereinigten AK lagen im Bereich der Inhibition durch Präimmunserum.

xx) Vorinkubation mit Komplement

Bei Absorption mit Schaferythrozyten verringerte sich die Inhibition auf etwa 48 %. Hühner Anti-Maus IgG und Hühner Anti-Maus κ-Kette-Antiserum inhibierte zu etwa 23 %. Affinitätschromatographisch gereinigte Antikörper mit αIgM p.c.-Spezifität inhibierten die CMC fast vollständig (91 %), während μ-spezifische Hühner-AK eine Inhibition von 45 % zeigten bezogen auf Hü αKLH-gereinigte Antikörper (siehe Tab. 24). Normale Hühner-Immunglobuline (Cohn II-Fraktion) hatten wie Hü αKLH-Antikörper keinen wesentlichen inhibitorischen Effekt. Die Absorption der gereinigten AK mit Schaf- und Mauserythrozyten reduzierte den Effekt der Vorinkubation auf etwa 27 % Inhibition.
Wurde versucht, mit Hühner αμ-Antikörpern und Komplement die Effektorzellen während der Vorinkubation zu lysieren, ließ sich eine Inhibition der CML von 39 % demonstrieren.
Diese Inhibitionswerte beziehen sich auf die Zytotoxizität von T-Lymphozyten, die mit Hühner αKLH-AK und Komplement vorinkubiert worden waren. Die effektive Lyse von Lymphozyten in diesem Komplement-Ansatz läßt sich mit dem Eosin-Test direkt zeigen (Abb. 41).
Ein ebenfalls getesteter, affinitätschromatographisch gereinigter Hü αMIgG-AK inhibierte nur zu etwa 11 %, während Hü-AK gegen leichte Ketten vom Kappa-Typ zu etwa 26 % inhibierten.

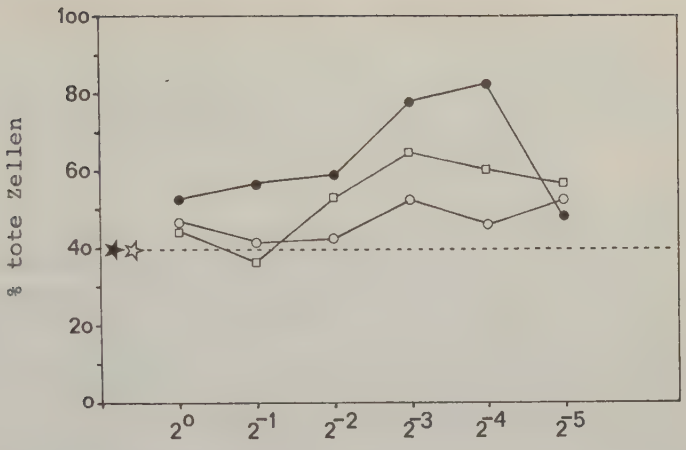


Abb. 41: Lyse von C57bl-Milzzellen mit Hü αIgM p.c.-Antiserum und einer Kombination von Hühner- und Meerschweinchen-Komplement

●—●	1/50	Normales	+ 1/9	Meerschweinchen-	+ AS
○—○	1/50	Hühner	+ Ø	Komplement	+ AS
□—□	Ø	Serum	+ 1/9	"	+ AS
★–	1/50	"	+ 1/9	"	Ø AS
☆–	Ø	"	Ø	"	Ø AS

8.2. Effekt von Hühner-Anti-IgM-Fragment-Antiseren und gereinigten Antikörpern

Von den Hühner-Antiseren gegen gereinigte Fragmente von Maus-IgM zeigten zwar das Antiserum gegen oxidierte μ-Ketten etwa 33 % Inhibition, AS gegen oxidiertes Fd-26000 etwa 50 % und AS gegen Fd-44000 sogar etwa 67 % Inhibition bezogen auf Hü αKLH-Antiserum. Es war allerdings nicht möglich, diese Ergebnisse mit gereinigten, Erythrozytenabsorbierten Antikörpern

zu reproduzieren. Diese zeigten keine Inhibition der spezifischen Zytotoxizität bezogen auf gereinigte Hü αKLH-Antikörper.

Tabelle 25: Inhibition der CMC mit Hühner-Anti-μ- und Fdμ-Antiseren bzw. daraus präparierten Na_2SO_4-Präzipitaten und affinitätschromatographisch gereinigten Antikörpern

Spezifität	% Inhibition der spezifischen Zytotoxizität[x)] Antiserum	Na_2SO_4 Präzipitat	affinitätschromatographisch gereinigter Antikörper
Absorption	Ø	Ø	Erythrozyten
Hü $\alpha\mu_{oxidiert}$	33 ± 15 (2)	17 ± 10 (3)	2 ± 3 (2)
Hü αμ	0 (3)	0 (3)	0 (3)
HüαFd26000$_{ox}$	50 ± 18 (2)	16 5 (2)	0 (5)
HüαFd26000	0 (3)	0 (3)	-
HüαFd44000$_{ox}$	0 (2)	0 (3)	-
HüαFd44000	67 ± 38 (3)	23 ± 8 (3)	1 ± 2 (5)
		SRBC absorbiert: 25 ± 10 (2)	

x) Die Inhibition der spezifischen Zytotoxität wurde auf die spezifische Zytotoxizität bei Vorinkubation mit Hü αKLH-Antiserum bzw. Na_2SO_4-Präzipitat und affinitätschromatographisch gereinigte Antikörper bezogen

IV. D I S K U S S I O N

1. Vergleich affinitätschromatographischer und "klassischer" Trenn-Methoden zur Gewinnung von Maus-IgM aus normalem Maus Serum

Von der Theorie der Affinitätschromatographie her konnte postuliert werden, daß IgM in einem Präparationsschritt aus normalem Mausserum mit hoher Reinheit isoliert werden kann. Zu diesem Zweck sollte ein Kaninchen-Antikörper mit Spezifität gegen Maus μ-Ketten eingesetzt werden. Doch trotz der nachgewiesenen Spezifität der an Sepharose gekuppelten Antikörper wurden neben IgM auch IgA, geringe Mengen von IgG und Albumin eluiert.

Die Hauptkontamination ist Serum IgA, das im NMS in vergleichbarer Konzentration wie IgM (IgA: 0.7 mg/ml, IgM: 0.8 mg/ml in Balb/c Mäusen (143)) vorliegt. Während Serum IgM überwiegend als Pentamer vorliegt, kommt IgA in verschiedenen oligomeren Formen bis zum Tetramer vor. Das Molekulargewicht der α-Kette beträgt etwa 55 000.

Für die Schwierigkeit, IgM möglichst rein zu präparieren, sind die ausgeprägten strukturellen Homologien der Immunglobuline und ihre vergleichbaren Molekulargewichte verantwortlich. Im MG-Bereich von etwa 10^6 d liegen sowohl das pentamere IgM als auch tetrameres IgA und IgG-Aggregate.

Zusätzliche Komplikationen bei der Reinigung ergeben sich nach Experimenten von Heremanns et al. (157), die fanden, daß 53 % der getesteten humanen IgA- und 74 % der IgM-Plasmozytom Proteine mit Albumin komplexiert waren. In einer genaueren Untersuchung von Mannik et al. (158) wurde demonstriert, daß Albumin sowohl am IgM als auch an IgA über kovalente Disulfidbrücken gebunden war. Im Durchschnitt war jedes vierte IgA-Dimer mit Albumin im molaren Verhältnis von 1:1 komplexiert (159).

Die Adsorption von Immunglobulin an Albumin dürfte aber vorwiegend elektrostatisch bedingt sein. Versuche, die Assozia-

tionen von Ig und Albumin mit Hilfe hochmolarer Puffer (z.B. 0.5 M Natriumchlorid) zu verhindern, führten zu keiner wesentlichen Verbesserung der Reinheit des isolierten IgM.

Damit dürfte die Albumin-Verunreinigung der IgM-Fraktion nach Affinitätschromatographie sowohl auf die Adsorption geringer IgG-Mengen als auch auf die Bindung von IgA an die Kaninchen Anti-μ Säule zurückzuführen sein. Darüberhinaus sind jedoch wahrscheinlich kreuzreagierende Determinanten auf IgM und IgA an der Adsorption beteiligt, da durch die Immunisierung der von der Maus phylogenetisch weit entfernten Hühner kreuzreagierenden AK mit erhöhter Wahrscheinlichkeit induziert wurden. Die niedrigere Avidität der αμ-AK für kreuzreagierende Moleküle dokumentiert sich auch in den milden Bedingungen, bei denen ein großer Teil der Verunreinigungen entfernt werden kann, ohne daß IgM eluiert wird (siehe Abb. 9, Bahn e).

Zusammen mit dem Befund, daß die schweren Ketten mit 55 000 d immer mit leichten Ketten assoziiert auftreten und daß in der Immunodiffusion eine Reaktion von Kaninchen Anti Maus IgA-Antiserum mit den IgM-Präparationen gefunden wurde, sprechen diese Argumente dafür, daß es sich bei der Hauptkontamination des IgM um IgA handelt.

Versuche, durch Chromatographie über Protein A-Sepharose und "Blue Sepharose" die Reinheit des von der αμ-Säule eluierten IgM zu verbessern, waren nur teilweise erfolgreich (siehe III, 1.3.). Durch Vorelution der mit niedrigerer Affinität gebundenen Verunreinigungen vor allem des IgA konnte die Reinheit des IgM weiter erhöht werden. Es war allerdings nicht möglich, trotz Kombination der beschriebenen Methoden die Verunreinigungen unter 15 % zu senken.

Die Ausbeute an IgM betrug etwa 30 % des theoretisch zu erwartenden Wertes. Zwar konnte IgM quantitativ aus dem Serum entfernt werden, doch ging der größere Teil davon bei Elution und Einengung in Form unlöslicher Präzipitate verloren.

Im Gegensatz zur Affinitätschromatographie mit der Kαμ-Säule gestattete die "klassische" Methode der Kombination von Pe-

vicon-Elektrophorese und Gelchromatographie zwar den Durchsatz größerer Serummengen (20 ml pro Lauf), jedoch war die Ausbeute an IgM in vergleichbarer Reinheit mit etwa 2 mg aus 100 ml NMS unvergleichlich geringer.

Damit bietet sich trotz aller beschriebenen Schwierigkeiten die Affinitätschromatographie zur Reinigung größerer Mengen von IgM aus Serum an, da sie eine ca. fünfzehnfach höhere Ausbeute ermöglicht.

Die Reinheit des in der Literatur wiederholt beschriebenen sog. "reinen" IgM aus normalem Serum, isoliert durch eine Kombination von Pevikonelektrophorese und Gelchromatographie, muß zumindest im Falle von Maus IgM kritisch betrachtet werden, da sich bei Anwendung der hochempfindlichen SDS-Disk-PAGE in allen erhaltenen IgM-Fraktionen noch Kontaminationen durch andere Proteine nachweisen ließen.

Dieses Problem ist aber bei der Verwendung von IgM als Antigen zur Erzeugung von Antiserum durch entsprechende Absorption der erhaltenen Antiseren zu umgehen.

2. Vergleich der Antikörper-Aktivitäten in verschiedenen Hühner-Antiseren

Die in Hühnern erzeugten Antiseren gegen Maus IgM aus NMS wurden mit Maus- und Schaferythrozyten sowie Maus-Mastozytomzellen absorbiert. Nach weiterer Absorption des Antiserums an insolubilisiertem Maus IgG und Maus Albumin wurden die μ-spezifischen Antikörper von einer IgM-Säule eluiert.

In der ID nach Ouchterlony zeigten die Antiseren gegen komplettes IgM und die daraus isolierten, μ-spezifischen Antikörper eine deutliche Präzipitation mit Maus IgM p.c. Eine Aktivität gegen IgA, der Haupt-Kontamination (neben Spuren von IgG und Albumin) des zur Immunisierung verwendeten IgM p.c., ließ sich in der ID der gereinigten AK nicht mehr nachweisen.

Die gegen isolierte μ-Ketten erzeugten Antiseren und die daraus affinitätschromatographisch gereinigten Antikörper hatten gerade noch nachweisbare ID-Aktivität gegen IgM, während die Anti-Fdμ-Antiseren und -Antikörper keine Reaktivität zeigten.

In der höherempfindlichen Passiven Hämagglutination (PH) konnte dagegen auch für die Anti-Fdμ-Antiseren und Antikörper noch eine Aktivität gegen IgM nachgewiesen werden. Generell hatten die Antiseren gegen μ und μ-Fragmente im Vergleich zu den Anti-IgM-Antiseren auch in der PH deutlich geringere Titer.

Ein Grund für die schwache Reaktivität der Antikörper könnte in der Maskierung von immunogenen Determinanten auf den für die Immunisierung verwendeten IgM-Fragmenten durch SDS-Mizellen liegen, die sich trotz Chromatographie über Dowex nicht vollständig entfernen ließen.

Zu berücksichtigen ist ferner, daß für die passive Hämagglutination Erythrozyten mit komplettem IgM beladen worden waren. Da die Anti-IgM-Fragment-Antiseren auch Determinanten erkennen, die im nativen IgM-Molekül nicht zugänglich sind, konnte nur ein Teil der tatsächlich vorhandenen AK-Aktivitäten in der passiven Hämagglutination nachgewiesen werden.

Die PH mit IgM-Fragment kodierten Erythrozyten wurde wegen der relativ großen, dafür benötigten Mengen an IgM-Fragmenten nicht durchgeführt.

3. Nachweis der Bindung von Anti IgM-Antikörpern auf Maus-Lymphozyten in Immun-Radioautographie und Immunfluoreszenz

Auf Maus B-Lymphozyten konnte die Bindung von Kaninchen- und Hühner-Antikörpern gegen Maus IgM sowohl in Radioautographie (RAG) als auch in der indirekten Immunfluoreszenz (IF) gezeigt werden. Das Bindungsmuster entsprach hinsichtlich

Stärke und Prozentsatz der markierten Zellen den in der Literatur beschriebenen Werten (9,22).

Wurden die aus Anti IgM-Antiserum isolierten Anti-μ spezifischen Antikörper jedoch auf Thymozyten und peripheren T-Lymphozyten getestet, so reagierten die AK von Huhn und Kaninchen sehr unterschiedlich. Während keiner der getesteten Kaninchen-AK in der empfindlichen Immunradioautographie eine deutliche Reaktivität mit Thymuszellen zeigte, war eine Bindung der Hühner-AK in RAG und IF sowohl auf Thymozyten als auch auf peripheren T-Lymphozyten nachweisbar.

Die Hühner-AS und isolierten AK wurden mit Schaf- und Mauserythrozyten absorbiert, ohne daß eine meßbare Änderung der Bindungseigenschaften in der indirekten IF beobachtet wurde. Die T-Lymphozyten zeigten im Gegensatz zu den B-Lymphozyten mit ihrer sehr starken Ringfluoreszenz eine schwächere, sehr feinkörnige Ringfluoreszenz, die sich jedoch deutlich von den Kontrollpräparationen mit Hühner-Anti-KLH Antikörpern abhob.

Erythrozyten absorbierte , affinitätschromatographisch gereinigte Antikörper gegen ein nicht verwandtes Antigen waren als Kontrolle notwendig, um die unspezifische Adsorption von Immunglobulin immunisierter Hühner auf Maus Lymphozyten abschätzen zu können.

Die Absorption der Anti-μ-Antikörper mit nicht Ig-tragenden P815-Mastozytomzellen der Maus führte zu einer drastischen Reduktion (von 83 % auf 7 %) der Anfärbung von Thymuszellen. Dagegen wurden periphere T-Lymphozyten aus der Milz, durch Passage über Nylon-Wolle hochangereichert, unverändert angefärbt (61 % IF-positiv), ebenso die T-Lymphomzellen der Linie WEHI 22 (73 %).

Dieser Absorptionseffekt läßt sich mit kreuzreagierenden Determinanten der Zellmembran von P815-Zellen erklären, welche auf peripheren T-Zellen fehlen.

Ein generelles Problem der Absorption mit Zellen ist der unspezifische Verlust von Antikörper durch Adsorption an die Zellmembran, z.T. auch über Fc-Rezeptoren.

Da anzunehmen ist, daß auf Thymozyten μ-ähnliche Determinanten in erheblich geringerer Konzentration ausgeprägt sind als auf peripheren T-Zellen, kann durch den Absorptionsschritt die Nachweisgrenze der IF erreicht worden sein.

Unterstützt wird diese Erklärung durch Avrameas et al. (128), die mit dem Enzym Immuno Assay "FUMELIA" auf dem Einzelzellniveau nachgewiesen haben, daß auf peripheren Maus T-Zellen die 5-fache Menge an μ-Determinanten im Vergleich zu Thymozyten exprimiert wird.

Der relativ niedrige Prozentsatz gefärbter Zellen von 50 - 70 % bei peripheren T-Zellen und 45 - 65 % bei Milzzellen läßt darauf schließen, daß nur bestimmte Populationen der reifen T-Zellen angefärbt werden. Da B-Lymphozyten etwa 30 - 45 % der Milzzellen ausmachen (155), ergibt sich rechnerisch für die erkannten T-Zellen ein Prozentsatz von 15 - 20 % in der Milz. Diese Population wird durch die Passage über Nylon-Wolle stark angereichert und bildet etwa 60 % der peripheren T-Zellen.

Interessant dürfte die weitere Charakterisierung dieser von Hü αμ-AK erkannten Subpopulation von reifen T-Zellen sein. Ein Versuch, diesen T-Zellen eine Funktion zuzuordnen, wird weiter unten bei den Inhibitionsexperimenten von MLC und CMC diskutiert.

Die Absorption der Hühner Anti IgM Antiseren mit Schaferythrozyten beeinflußte den Prozentsatz der IF-positiven Milz, Thymus und peripheren T-Zellen kaum.

Auch die Absorption der aus Hü αIgM p.c.-Antiserum gereinigten μ-spezifischen AK mit Schaf und Mauserythrozyten erbrachte keine Veränderung der Bindungseigenschaften, weder auf B-Zellen (aus Milzen von nackten Mäusen) noch auf peripheren T- oder Thymuszellen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß für die Bindung von Hü αμ-Antikörpern an reife, periphere T-Lymphozyten und an T-Lymphomzellen der Linien WEHI 7 und 22 keine Determinanten verantwortlich sind, die auf Erythrozyten aus Schaf und Maus

sowie auf Mastozytom P815-Zellen der Maus vorkommen. Die AK-Aktivität war ebenfalls nicht absorbierbar mit Mausserumproteinen (ohne Immunglobuline) oder mit Maus IgG, das restliche AK-Aktivitäten gegen leichte Ketten, γ-Ketten und mögliche Zuckerdeterminanten des IgG-Moleküls entfernte.

Dagegen konnte durch Absorption mit WEHI 22-T-Lymphom-Zellen die IF-Reaktivität der Hü αμ-AK gegen WEHI 22 und periphere T-Zellen sowie Thymuszellen fast vollständig absorbiert werden.

Die Passage der αμ-spezifischen AK über Sepharose-gekuppeltes IgM p.c. absorbierte die Aktivität in der IF ebenfalls vollständig, während die Absorption des kompletten Hü Anti IgM p.c.-Antiserums mit der IgM p.c.-Säule die IF positiven peripheren T-Zellen von 80 % auf etwa 20 % reduzierte.

4. Bindung von Anti IgM-Fragment Antikörpern auf Maus Lymphozyten in der indirekten Immunfluoreszenz

Neben den unter IV.2. diskutierten Möglichkeiten der Absorption von Antiseren zur genaueren Definition der Spezifitäten wurde versucht, durch eine Immunisierung mit Fdμ-Fragmenten, bestehend aus VH- und CH1-Domäne der μ-Kette, Antikörper mit höherer Spezifität gegen VH-Determinanten zu induzieren.

Die Immunisation mit isolierten μ-Ketten erhöhte die Chance, Antikörperspezifitäten gegen μ-Ketten-Dimere zu induzieren (siehe IV, 3.1.), während auf dem Fdμ-Fragment als Antigen die Immunodominanz der VH-Determinanten ausgeprägter sein sollte (siehe VI, 3.2.).

Ein öfter wiederholtes Argument gegen die serologische Charakterisierung von Zelloberflächendeterminanten ist die mangelnde Reinheit der zur Immunisierung verwendeten Antigene und die mögliche Kreuzreaktivität der erhaltenen Antiseren mit ubiquitär vorkommenden Determinanten.

Um diesen Argumenten zu begegnen, wurden IgM-Fragmente in

präparativen SDS-Polyacrylamidgelen gereinigt und als isolierte Banden für die Immunisation eingesetzt.

Außerdem wurde eine Testgruppe der Hühner mit μ-Ketten und Fdμ-Fragmenten immunisiert, die zum Abbau der Kohlenhydratanteile mit Perjodat oxidiert worden waren (siehe IV, 3.). Auf diese Weise wurde die Induktion von Kohlenhydrat-spezifischen Antikörpern verhindert, die u.U. mit Kohlenhydraten der Zellmembran kreuzreagieren könnten.

Diese Aspekte sollen nun im einzelnen diskutiert werden.

4.1. Induktion von Anti-V_H-Antikörpern durch Immunisierung mit Fdμ-Fragmenten

Durch Papain-Verdauung von Maus IgM wurden zwei Haupt-Fragmente der schweren Kette erzeugt. Die immunchemische Analyse und die Bestimmung der Molekulargewichte der isolierten Spaltprodukte unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen in der SDS-Disc-PAGE erlaubten die Identifizierung der Fragmente. Es handelt sich vorwiegend um ein Fdμ von 44 000 d, welches aus den ersten drei Domänen der μ-Kette besteht, und ein Fdμ von 26 000 d, das aus den ersten beiden Domänen der μ-Kette aufgebaut ist. Beide enthalten also die variable Domäne (V_H) der H-Kette von IgM neben einer (Cμ1) bzw. zwei (Cμ1 und Cμ2) konstanten Domänen.

Die Immunisierung mit diesen isolierten Fd-Bruchstücken sollte u.a. die Chancen erhöhen, AK gegen Rahmendeterminanten der V_H-Domäne zu erzeugen, unter der Vorstellung, daß diese Determinanten auch im T-Zell-Rezeptor ausgeprägt sind. Diese Determinanten werden nicht durch die Bindungsspezifität determinierenden hypervariablen Regionen der Polypeptidkette, der sog. idiotypischen Determinanten, gebildet, sondern durch die Regionen mit geringerer Variabilität.

Antikörper gegen diese sog. Rahmendeterminanten können nach Reth et al. (160) bis zu 90 % der gegen die V_H-Region erzeug-

ten monoklonalen Anti-idiotypischen Antikörper bilden.

In der Immunfluoreszenz färbten Hühner-AK gegen Fdμ44000 etwa 30 % der peripheren T-Zellen und Thymozyten an. Das entspricht etwa dem gleichen Prozentsatz IF-positiver Zellen, die mit dem Hü $\alpha\mu_{oxidiert}$-Antikörper reagierten.

Im Gegensatz dazu färbten Antikörper gegen $Fd\mu 26000_{oxidiert}$ etwa 60 % der peripheren T-Zellen und 75 % der Thymozyten an. Da das Fdμ von 26 000 d zudem weitgehend von Zuckern befreit worden war, war eine Induktion von Antikörpern gegen Zuckerdeterminanten nicht wahrscheinlich. Außerdem wären solche Aktivitäten dann in mindestens gleichgroßem Umfang auch bei den αμ- und αFdμ44000-Antikörpern zu erwarten, die ein weitgehend gleiches Spektrum von Determinanten erkennen, die möglicherweise auf den konstanten Domänen (CH) liegen.

Auffallend war, daß die T-Lymphomlinie WEHI 22 von allen getesteten Hühner-Antikörpern gegen IgM, μ und Fdμ zu 80 - 90 % angefärbt wurde. Der Immunfluoreszenz-Test dieser Zellen zeigte eine starke IF-Reaktion. Außerdem fiel ein grobscholliges Anfärbungsmuster auf im Gegensatz zu der feinkörnigen Färbung der nicht malignen T-Zell-Populationen. Die Intensität der IF-positiven WEHI-Zellen war durchaus mit der Fluoreszenz von B-Lymphozyten vergleichbar.

Die starke Reaktion der WEHI 22-Zellen könnte durch eine höhere Konzentration von IgT an der Zelloberfläche und/oder in einer besseren Zugänglichkeit des präsumptiven IgT für Anti-Ig-Antikörper zurückzuführen sein. Ein Hinweis auf eine eventuell andersartige Präsentation des sog. IgT auf WEHI 22-Zellen kommt von Harris et al. (95), die in immun-radioautographischen Analysen eine Reaktion von Kaninchen Anti-Maus-IgM-Antiseren mit WEHI 22-Lymphomzellen, nicht jedoch mit peripheren T-Lymphozyten und Thymozyten fanden.

4.2. Neue Antigendeterminanten auf isolierten µ-Ketten

Die Analyse des T-Zell-Rezeptors mit Anti-idiotypischen Antikörpern nach Binz, Wigzell (64) weist auf ein Rezeptormolekül ohne leichte Ketten hin. Cone et al. dagegen fanden (122) mit Kaninchen Anti L-Ketten Antiseren nicht-kovalent gebundene leichte Ketten zusammen mit einem -S-S-gekoppelten Schwere-Ketten-Dimer. Nach diesen Autoren soll das Membran-Ig eine größere Hydrophobizität als Serum-IgM besitzen, eine besondere Eigenschaft, die von Robinson et al. (67) auch für isolierte µ-Ketten des Plasmozytom-IgM104E beschrieben wurde.

Sollte der T-Zell-Antigen-Rezeptor aus einem Schwere-Ketten-Dimer aufgebaut sein, mit einer abweichenden Assoziation der leichten Ketten im Vergleich zu B-Zell Ig, ist es sehr wahrscheinlich, daß dadurch neue Konformationsdeterminanten erzeugt werden.

Durch die Immunisierung mit isolierten µ-Ketten, die wegen ihrer hohen Aggregationstendenz (67) zum großen Teil als Polymere präsentiert werden, wurden die Voraussetzungen für die Induktion neuer Antikörperspezifitäten geschaffen.

In der indirekten Immunfluoreszenz wurden jedoch mit den Antikörpern gegen isolierte µ-Ketten nicht mehr periphere T-Zellen angefärbt als mit µ-spezifischen Antikörpern, die aus Antiserum gegen komplettes IgM isoliert worden waren. Daraus ergibt sich kein Hinweis auf die Anwesenheit von neuen, auf isolierten µ-Ketten präsentierten Determinanten auf reifen T-Lymphozyten.

4.3. Überlegungen zur Frage der Kontamination der verwendeten Antigene

Ein besonders gravierendes Argument war, daß nicht die Anti-μ-Reaktivität für die Anfärbung von T-Zellen verantwortlich war, sondern nicht näher definierte AK-Spezifitäten gegen kontaminierende Membran-Proteine aus dem zur Präparation des IgM p.c. verwendeten normalen Mausserum. Gemäß diesem Einwand könnte postuliert werden, daß AK gegen solche hochimmunogenen Antigene via Affinitätschromatographie angereichert wurden und für die Bindung an T-Zellen verantwortlich waren.

Loor (66) berichtete, daß Hühner-Antiseren gegen verschiedene Maus-Myelom-Proteine die T-Zellen verschiedener Säugetierspezies anfärbten. Wurden zur Immunisierung der Hühner $F(ab')_2$-Fragmente von Kaninchen IgG statt Maus-Myelom-IgG verwendet, fanden sich zwar AK-Aktivitäten gegen B-Zell-Membran Ig (mIg), jedoch keine IF-Reaktivität gegen T-Zellen. Dieser Autor führte daher die Aktivität der Hühner Anti-Maus-Ig-Antiseren auf Antikörper zurück, die gegen kontaminierende Moleküle in der Antigenpräparation gerichtet waren und die mit Determinanten der Lymphozytenmembran kreuzreagierten.

Bei der hier angewandten Methode konnten diese Argumente durch die Isolation der μ-Ketten und Fdμ-Fragmente über die präparative Polyacrylamidelektrophorese weitgehend entkräftet werden. Da die wiederholte Elektrophorese der isolierten IgM-Fragmente in drei verschiedenen Gel-Konzentrationen der SDS-Disc-PAGE immer nur eine einzige Bande ergab, ist eine Kontamination durch ein gleich großes Protein unwahrscheinlich. Insbesondere die Glykoproteinnatur der IgM-Fragmente legt den Schluß nahe, daß die unterschiedlich glycosidierten Proteine in Abhängigkeit von der Gelkonzentration (68) verschiedene Mobilitäten aufweisen sollten.

4.4. Kreuzreagierende Kohlenhydrat-Determinanten

Bei der Immunisierung von Hühnern mit oxidierten μ-Ketten wurden AK induziert, die in der indirekten IF mit dem gleichen Anteil von peripheren T-Zellen (etwa 35 - 40 %) reagierten wie Antikörper gegen nicht oxidierte μ-Ketten. Von den Thymozyten jedoch wurden mit den letzteren nur ca. 35 % angefärbt im Gegensatz zu den 86 %, die mit αμ-Antikörpern reagierten.

Es war somit nicht ausgeschlossen, daß Antikörper gegen Kohlenhydratreste an der Reaktion gegen Thymozyten beteiligt waren. Antikörper gegen derartige Determinanten können auch für den Absorptionseffekt verantwortlich sein, den die Präinkubation mit P815-Mastozytomzellen auf die Reaktivität der αIgM-pc-Antiseren hatte.

Wie Vitetta (185) zeigte, unterscheiden sich die Glykoproteine auf der Zelloberfläche von Thymozyten deutlich von denen peripherer Lymphozyten. Da im Thymus überwiegend unreife T-Zellen enthalten sind, könnten z.B. Differenzierungsantigene via Zuckerdeterminanten erkannt werden, die auf den reifen, über Nylonwolle angereicherten T-Lymphozyten der Milz fehlen.

Kreuzreagierende Zuckeranteile auf Immunglobulinen und Zelloberflächen wurden von verschiedenen Autoren beschrieben. So fanden Mattes et al. (125) mit Kaninchen Anti Frosch-IgM-Antiserum in der Immunfluoreszenz Bindung auf Thymozyten und Granulozyten. Diese Aktivität konnte mit Frosch-IgM und einer nicht-Immunglobulin-Komponente aus Frosch-Plasma, aber nicht mit IgG absorbiert werden. Außerdem war diese kreuzreagierende Determinante sensitiv gegen Perjodatoxidation, jedoch resistent gegen Reduktion und Alkylierung bzw. Pronaseverdauung. Die Autoren schlossen daraus auf die Kohlenhydrat-Natur dieser ubiquitären Determinanten.

Merler et al. (126) isolierten aus verdautem humanem IgM fünf Glycoproteine. Spezifische Antikörper dagegen wurden durch Immunadsorption aus einem Kaninchen Anti IgM-Antiserum

isoliert. In der direkten Immunfluoreszenz zeigte sich, daß diese AK einen Großteil peripherer und tonsillärer Lymphozyten anfärbten.

Ivany et al. (127) berichteten über eine Kreuzreaktion zwischen Schaf-IgM und Erythrozyten, die durch Schweine-Blutgruppensubstanz inhibierbar war. Diese Kohlenhydrat-Determinanten wurden nur mit Hühner-Antiseren, nicht aber mit Säugetier-Antiseren gegen Schaf- oder andere Säuger-Erythrozyten erkannt. Sie waren auf Erythrozyten und in Seren verschiedener Säugetier-Spezies variable ausgeprägt.

Bei der Immunisierung von Hühnern mit Forellen-IgG und KLH erhielten Yamaga et al. (163) kreuzreagierende Antikörperspezifitäten mit niedriger Affinität, die mit L-Fukose zum großen Teil inhibiert werden konnten. Absorption von Anti-IgG-AS mit KLH und vice versa entfernte die kreuzreagierenden AK, doch verringerte sie den Titer der höheraffinen AK zum jeweiligen homologen Antigen kaum. Mit KLH absorbiertes Hühner-Anti-Forellen IgG-Antiserum zeigte keine Bindung mehr.

Dieser Befund ist besonders interessant, da auch in der vorliegenden Arbeit als Kontrollen Hü αKLH-AS und AK in Immunfluoreszenz und Immunpräzipitation von Zell-Lysaten verwendet wurden. Zwei der in drei Hühnern erzeugten Antiseren gegen KLH und die daraus isolierten AK zeigten in der indirekten IF eine Anfärbung von bis zu 15 % der getesteten Milz- und Thymuszellen, die jedoch komplett mit Schaferythrozyten absorbierbar war.

Um diese, von verschiedenen Autoren beschriebenen Möglichkeiten der Kreuzreaktion von Zuckerdeterminanten auszuschließen, wurden neben dem weitgehenden oxidativen Abbau der Kohlenhydrate auf den zur Immunisierung verwendeten μ-Ketten und Fdμ-Fragmenten alle Antiseren und Antikörper mit Erythrozyten und zum Teil mit kernhaltigen Zellen absorbiert. Außerdem wurden bei der Isolierung μ-spezifischer AK aus Hühner αIgM p.c.-AS mit insolubilisierten, nicht-Ig-enthaltenden Maus-Serumfraktionen absorbiert.

Diese Absorption mit Mausserum-Proteinen (ohne Ig) zusammen mit Maus IgG (zur Erzeugung der μ-Spezifität) hatte in der Radioautographie keinen wesentlichen Effekt auf die Bindung von gereinigten Hühnerantikörpern an Thymuszellen, sodaß Zucker-Kreuzreaktionen mit Serum-Proteinen nicht wahrscheinlich sind. Sie scheinen aber für die AK-Bindung der untersuchten Hühner-AK auf Thymozyten eine gewisse Bedeutung zu besitzen, da Hühner-AK gegen oxidierte und nicht-oxidierte isolierte μ-Ketten große Unterschiede zeigten.

Inwieweit individuelle Schwankungen in der Immunantwort der immunisierten Hühner für diese Unterschiede verantwortlich sind, kann wegen der geringen Zahl immunisierter Hühner pro Antigen (je zwei) nicht entschieden werden.

5. Analyse von Immunpräzipitaten aus den Lysaten radiojodierter Lymphozyten der Maus

Da die Frage möglicher Kreuzreaktionen der eingesetzten Hühner-AK mit Bindungsstudien wie z.B. der Immunfluoreszenz nicht zu beantworten war, müßten die erkannten Strukturen auf molekularer Ebene näher definiert werden.

Ein wichtiger Parameter für die Charakterisierung der Membranantigene ist das Molekulargewicht der von den Antikörpern erkannten Membrankomponenten. Es wurde durch die elektrophoretische Auftrennung der Immunpräzipitate von Zell-Lysaten bestimmt.

Im Gegensatz zu den untersuchten B-Zellen, auf deren Oberfläche neben L-Ketten μ- und δ-Ketten nachweisbar waren, konnte auf allen untersuchten Populationen von T-Lymphozyten (periphere T-Zellen, Thymozyten, MLR-aktivierte T-Lymphoblasten, T-Lymphomzellen) mit den eingesetzten Antikörpern (Hü αIgM p.c., Hü αμ und Hü $\alpha Fd\mu 26000_{oxidiert}$) immer ein Molekül mit gleichem Aufbau präzipitiert werden. Es zerfällt bei Reduktion in zwei verschiedene Ketten entsprechend den Serum-Immunglo-

bulinen und dem Ig der B-Zell-Membran. Die leichte Kette des "IgT" mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 23 000 d komigriert mit den L-Ketten der Immunglobuline. Im Gegensatz dazu zeigt die schwere Kette des "IgT" eine Wanderungsgeschwindigkeit, die zwischen der der μ-Kette und δ-Kette liegt. Daraus errechnet sich ein apparentes Molekulargewicht von etwa 70 000 d.

Mit Hühner Anti μ-Ketten spezifischen Antikörpern präzipitierte Lysate von I-125 markierten peripheren T-Zellen wurden auch unter nicht reduzierenden Bedingungen in 10 % und 7.5 % Polyacrylamidgelen untersucht. Die Hauptbande wanderte dabei etwas schneller als Maus IgG und zeigte ein apparentes Molekulargewicht von 130 - 140 000 d. Wechselnde Mengen von Radioaktivität im μ-Bereich lassen auf eine leichte Dissoziierbarkeit des 130 - 140 000 d-Moleküls schließen, das wahrscheinlich aus zwei 70 000 d-Molekülen aufgebaut ist. Im 10 %-Gel sind neben der 130 - 140 000 d Bande und der "Aktin"-Bande bei etwa 40 000 d auch eindeutige Radioaktivitätsgipfel im Bereich der L-Ketten vorhanden.

Diese Ergebnisse stimmen überein mit einem Modell des "IgT", das von Moseley et al. (168) vorgeschlagen wurde. Danach bauen schwere Ketten mit einer Mobilität zwischen μ und γ in der SDS-PAGE und leichte Ketten mit der Mobilität von Immunglobulin L-Ketten das "IgT"-Molekül auf. Die schweren Ketten mit 65 - 75 000 d apparentem Molekulargewicht bilden über -S-S-Brücken verbundene Dimere, die jedoch nicht den nativen Zustand auf der Zelloberfläche darstellen müssen. Eine Dimerisierung, die artefiziell durch die Isolierung entstehen kann, wurde z.B. auch für Histokompatibilitäts-Antigene beschrieben (184). Mit den schweren Ketten sind nichtkovalent leichte Ketten assoziiert. Sie zeigen in der SDS-PAGE die gleiche Mobilität wie die leichten Ketten der Serum-Immunglobuline.

Die hier vorgelegte Untersuchung über Immunpräzipitate mit Hü αμ-Antikörpern lassen sich am ehesten im Sinne dieses "IgT"-Modells von Moseley deuten.

Je zwei schwere Ketten scheinen kovalent verbunden, da ein Großteil der Radioaktivität im 130 - 140 000 d-Bereich in der SDS-PAGE wanderte unter nicht reduzierenden Bedingungen.

Allerdings scheint die Aufbereitung der Proben für die Elektrophorese (Immunpräzipitat-Staph.A-Komplexe 5 Minuten bei 100°C im SDS-Überschuß) schon einen wechselnden Anteil des 130 - 140 000 d-Moleküls zu dissoziieren, wie die 70 000 d-Bande in Abb. 40b zeigt.

Die leichten Ketten, die die gleiche Mobilität wie Immunglobulin L-Ketten zeigen, sind auch unter nicht reduzierenden Bedingungen in Anwesenheit von SDS nicht an die schweren Ketten gebunden. Sie erscheinen komplett dissoziiert zu sein, da weder bei ca. 95 000 d (H+L) noch bei 190 000 d (H_2+L_2) eine Bande auftritt. Selbst in einer Probe mit intakten Dimeren von schweren Ketten (siehe Abb. 40a) sind die L-Ketten komplett dissoziiert. Daraus kann geschlossen werden, daß die leichten Ketten nicht kovalent an die schweren Ketten gebunden sind. Über das molare Verhältnis der leichten zu den schweren Ketten kann nichts ausgesagt werden, sie kommen jedoch immer zusammen in allen untersuchten Immunpräzipitaten vor.

Eine schwere Kette mit einer Mobilität zwischen μ- und γ-Ketten wurde auch von Haustein et al. auf Thymuszellen (36) und auf T-Lymphomzellen (161) nachgewiesen. Die schwere Kette war immer zusammen mit leichten Ketten von gleicher Mobilität wie L-Ketten von Maus-Immunglobulinen nachweisbar.

Moleküle gleicher Größe (68 000 d, 24 000 d) fanden Szenberg et al. (131) mit Hühner Antiseren gegen $F(ab')_2$-Fragmente von Maus IgG auf Maus-Thymozyten neben wechselnden Mengen einer 140 000 d-Bande in SDS-Gelen unter reduzierenden Bedingungen.

Bei der Verwendung von Hühnerantiseren gegen das Maus-Myelon-Protein IgM104E konnten Hämmerling et al. (35) von Maus-Thymuszellen neben anderen Proteinen auch Moleküle mit Molekulargewichten von 71 000 d und 23 000 d isolieren.

Auch Binz und Wigzell präzipitierten mit antiidiotypischen Antikörpern von der Oberfläche normaler Ratten T-Lymphozyten (64) und alloantigen-aktivierter T-Lymphoblasten (164) ein Molekül von etwa 150 000 d. Unter reduzierenden Bedingungen spaltete es sich in Moleküle mit dem Molekulargewicht von ca. 75 000 d auf. Im Gegensatz zu den hier beschriebenen Ergebnissen konnten mit antiidiotypischen Antiseren jedoch keine Moleküle der Größe von L-Ketten in den Präzipitaten nachgewiesen werden.

Es scheint möglich, daß die L-Ketten bei der Isolierung der Zelloberflächenmoleküle verloren wurden, wie schon Moseley et al. (168) vermuteten, insbesondere wegen der von verschiedenen Autoren gefundenen nicht-kovalenten Assoziation von H- und L-Ketten des "IgT" (168,122). Nicht kovalent gebundene leichte Ketten kommen auch in sezernierten Immunglobulinen (insbesondere IgA) bei Menschen, Mäusen und Hühnern vor (171,172,173).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Autoren, die Antiseren mit Spezifität gegen leichte Ketten (35,36,122,131, 161) verwendeten, übereinstimmend schwere Ketten etwa gleicher Größe (65 - 75 000 d) und wechselnde Mengen leichter Ketten (23 - 25 000 d) in den Lysaten von T-Zellen nachweisen konnten.

Ein Membran-Ig der Struktur von Ratten-Serum-IgG mit schweren Ketten der Mobilität von γ-Ketten fanden dagegen Misra et al. (146) durch Radiojodierung von intakten oder Harnstoff/Essigsäure solubilisierten isolierten Plasma-Membranen von Thymozyten und nachfolgender Präzipitation mit Kaninchen Antiserum gegen Ratten IgG.

Bis jetzt liegt nur ein einzelner Bericht über den Versuch der biochemischen Charakterisierung von "IgT" vor. Moseley et al. versuchten, mit "peptide mapping"-Techniken die isolierten schweren (162) und leichten (183) Ketten des T-Lymphoms WEHI 22 auf Homologie zu zirkulierenden Immunglobulinen zu überprüfen. Sie fanden für die schweren Ketten des "IgT" 40 - 50 % Tyrosin-enthaltende Peptide gemeinsam mit μ

und α-Ketten, die jedoch nur zum Teil identisch waren mit denen, die μ- und α-Ketten gemeinsam hatten. Für die isolierten leichten Ketten des "IgT" wurde eine sehr nahe Verwandtschaft mit Ig-leichten Ketten vom Kappa-Typ gefunden. Keine Homologie konnte im Vergleich zu Immunglobulin-γ-Ketten und β_2-Mikroglobulin gefunden werden. Auch Albumin und virale Glykoproteine (gp71) zeigten eindeutig verschiedene Muster.

5.1. Die Natur der zusätzlichen Bande bei 40 - 45 000 d

Neben den beschriebenen leichten und schweren Ketten des "IgT" wurde ein weiteres Molekül mit einem app. Molekulargewicht von 40 - 45 000 d präzipitiert.

Hinweise auf die molekulare Natur dieser in wechselndem Umfang bei allen Immunpräzipitaten aus Lysaten radiojodierter Zellen auftretende Bande kommen von Delovitch et al. (133). Sie fanden sowohl in der zweidimensionalen Elektrophorese als auch mit "peptide mapping"-Studien, daß diese ubiquitäre Komponente mit Aktin identisch ist. Fechheimer et al. (134) fanden eine direkte Interaktion von Aktin mit Immunglobulinen in vitro. Diese Fähigkeit stellt nach Braun et al. (135) eine spezielle Eigenschaft von Membranimmunglobulinen dar.

Für die Aktin-Natur dieses 35 - 45 000 d-Proteins, das auch ein solubilisierter Fc-Rezeptor oder ein Degradationsprodukt sein könnte, spricht außerdem der Befund, daß durch die Vorpräzipitation des Zell-Lysates mit Kaninchen Anti-NMS Antiserum und NMS als Antigen die 35 - 45 000 d-Bande weitgehend eliminiert werden konnte (siehe III, 6.3.2.1., Abb. 29).

Allerdings wurde bei der Vorpräzipitation auch "IgT" in nicht vorhersehbarem Umfang mitpräzipitiert, da neben der "Aktin"-Bande auch die "IgT"-Banden entfernt wurden. Es ist nicht auszuschließen, daß im Membranverbund "IgT" direkt mit Aktin assoziiert ist und daß deshalb bei Entfernung des Aktins über Immunkomplexe auch IgT mit eliminiert wird.

5.2. Herkunft der präzipitierten Oberflächenmoleküle von T-Lymphozyten

Da bei den Präzipitationsversuchen die Zelloberflächen-Proteine durch LPO-katalysierte Radiojodierung markiert wurden, kann daraus keine Aussage über den Ort der Biosynthese der präzipitierten schweren und leichten Ketten gemacht werden. Entscheidend ist der Ausschluß der Adsorption von B-Zell-Produkten durch die auf aktivierten T-Zellen vorhandenen Fc-Rezeptoren (40,138). So konnten verschiedene Autoren (139, 140,141) nach der Exstirpation der Bursa fabricii, die bei Vögeln für die Entwicklung reifer B-Zellen verantwortlich ist, eine drastische Verringerung der Anzahl antigenbindender T-Zellen nachweisen; d.h. ein Teil der AG-Bindung auf T-Zellen wird durch passiv aufgenommenen Serum-Ig bewirkt.

Der totale Ausschluß von B-Zellen oder Plasmazellen als mögliche Quelle für zytophiles Ig in den verwendeten T-Zell-Populationen ist nicht möglich, da im Thymus bis etwa 2 % B-Zellen vorhanden sein können. Die über Nylonwolle gereinigten T-Zellen der Milz enthalten bis zu etwa 10 % B-Zellen, wie in III, 5.5. gezeigt wurde.

Als weitere T-Zell-Population mit möglicherweise angereicherten Alloantigen-Rezeptoren wurden MLC-Blasten verwendet. Die in einer gemischten Lymphozytenkultur induzierten und durch 1g-Sedimentation angereicherten T-Lymphoblasten können von B-Blasten (Plasmazellen) kontaminiert sein, von denen wegen ihrer hohen Ig-Syntheserate schon eine geringe Anzahl genügt, um die aktivierten T-Zellen via Fc-Rezeptor mit Oberflächen-Ig zu versorgen.

Bei der Verwendung der klonierten T-Lymphome WEHI 7 und WEHI 22, die in Langzeitkulturen gehalten wurden, ist zwar die Anwesenheit von B-Zellen und deren Produkten ausgeschlossen. Es besteht jedoch theoretisch die Möglichkeit, daß diese Zellen, bedingt durch ihre Transformation, für Ig kodierende, genetische Informationen exprimieren, die in dieser Form normalerweise in T-Lymphozyten unterdrückt sind. Auch

ist durch das Fehlen einer T-Zell-Funktion bei den WEHI 7/22-Zellen trotz des Vorhandenseins des für T-Lymphozyten typischen Thy-1 Markers der formale Nachweis des ausschließlichen T-Zell-Charakters dieser Zellklone schwierig. Als Hinweis auf die potentielle Fähigkeit von T-Zellen, Immunglobuline zu synthetisieren, kann der Befund von Storb et al. (170) gelten, die Messenger-RNA von Kappa-Ketten in T-Lymphozyten nachweisen konnten.

In verschiedenen Systemen allerdings wurden auch Hinweise für eine endogene Synthese von "IgT" gefunden.

So konnten Rieber et al. (37) nach Bindung von K-α-Maus Ig-Antikörpern und deren Fab-Fragmenten auf Thymuszellen einen metabolisch abgegebenen, hoch immunogenen Komplex mit Maus Ig-Determinanten nachweisen, der ein app. Molekulargewicht von 240 000 d zeigte. Bei einem 1:1 angenommenen Bindungsverhältnis von Fab und T-Rezeptor wurde ein app. MG von 190 000 d für das abgegebene Molekül errechnet.

Szenberg et al. (131) konnten in der indirekten Immunfluoreszenz die Bindung von Hühner-Antikörpern gegen $F(ab')_2$-Fragmente von Maus-IgG auf Maus-Thymuszellen und T-Lymphomzellen nachweisen. Sie fanden ebenfalls "capping" der Oberflächen-Immunglobuline und deren Verschwinden von der Zelloberfläche durch "shedding" oder Endozytose. Nach 4-stündiger Inkubation ließen sich auf 60 % der Thymozyten wieder eine Ringfluoreszenz mit Anti-$F(ab')_2$ demonstrieren. Die gesamte Aktivität dieser Hühner Antiseren war mit Myelom-Kappa-Ketten der Maus absorbierbar. Entsprechende Versuche von Marchalonis et al. (144) mit T-Lymphozyten aus Meerschweinchen zeigten "Neusynthese" der Oberflächen Igs nach 6 Stunden, dokumentiert mit IF und Elektronenmikroskopie. Weiter wurde die T-Zell-Natur der positiven Zellen durch gleichzeitige Rosettierung mit Kaninchen-Erythrozyten demonstriert.

Auch Binz et al. (53) berichteten über eine Resynthese "ihres" Rezeptormoleküls durch gereinigte T-Zellen nach Trypsinverdauung. Beweisen können diese Versuche dagegen die autochthone Synthese des "IgT" nicht, da auch neu-exprimierte Fc-

Rezeptoren auf T-Zellen die von kontaminierenden B-Zellen synthetisierten Immunglobuline aufnehmen können.

Der direkte Beweis für die endogene Synthese des IgT kann nur durch Experimente mit interner Markierung der Zelloberflächenproteine bei Ausschluß kontaminierender B-Zellen erbracht werden. Im einzigen bisher publizierten Bericht über interne Markierung der Zellproteine durch C-14-Aminosäuren (Singh et al. (145)) mit folgender Analyse der Anti-Ig-präzipitierbaren Strukturen in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden Proteine mit der Mobilität von γ-Ketten und zusätzlich von L-Ketten gefunden. In einem weiteren Experiment mit interner Markierung von Haustein et al. (142) wurde zwar die generelle Präzipitierbarkeit von T-Lymphom-Ig (WEHI 22) mit Anti-Ig-Antiserum beschrieben, doch wurden die präzipitierten Moleküle nicht näher charakterisiert.

Zwingende Hinweise für die endogene Synthese von T-Zell-Rezeptoren kommen von funktionellen Untersuchungen mit antiidiotypischen Antikörpern. Julius et al. (174) konnten durch Rekonstitution von Mäusen mit genetisch differenten Lymphozyten (Mäusechimären) die Idiotypen von Phosphorylcholin (PC)-spezifischen B- und T-Zellen unterscheiden. Die Experimente zeigten, daß die PC-spezifische Helferfunktion von T-Zellen vom Idiotyp der Donor-T-Zellen und nicht vom Idiotyp der B-Zellen und deren Produkten über antiidiotypische Antikörper zu beeinflussen war. Sie schlossen daraus, daß der PC-spezifische, Idiotyp-tragende T-Zell-Rezeptor kein passiv adsorbiertes T-Zell-Produkt sein kann.

In genetisch kontrollierten Studien fanden Krawinkel et al. (175) in ihrem System mit isolierten, für das Nitrophenyl-Hapten spezifischen Rezeptoren in Maus-Chimären, daß auf den T-Zell-Rezeptoren andere genetische Marker als auf den B-Zell-Rezeptoren und den zirkulierenden Antikörpern exprimiert waren. Sie folgerten daraus, daß die von T-Zellen stammenden Rezeptoren auch durch diese Zellen synthetisiert worden waren.

Da aber die Identität zwischen dem teilweise charakterisier-

ten, isolierten "IgT" und den funktionellen Antigenrezeptoren noch nicht bewiesen ist, ist die Frage nach der Herkunft der T-Zell-Rezeptoren noch nicht zu beantworten. Im übrigen schließen sich aquirierte und endogene Rezeptoren in Anbetracht der zu erwartenden Heterogenität der Rezeptor-Moleküle nicht aus.

6. MLC-Inhibitionsversuche mit Hühner- und Kaninchen-Antiseren und gereinigten Antikörpern

Nachdem die Bindung von Hühner-Antikörpern mit Spezifität für μ-Ketten und Fdμ-Fragmente auf T-Lymphozyten der Maus in der IF nachgewiesen und die Immunpräzipitation ein "IgT"-Molekül auf der T-Zelloberfläche gezeigt hatte, sollte in Inhibitionsversuchen untersucht werden, ob dieses Molekül an der Antigenerkennung beteiligt ist.

Wenn sich ein Antikörper an einen funktionellen T-Zellrezeptor für Antigen bindet, sind zweierlei Wirkungen denkbar. Entweder es kommt zu einer Blockade der Funktion durch sterische Hinderung der Antigenerkennung des Rezeptors oder es erfolgt eine Aktivierung der entsprechenden T-Zellen, wobei die Bindung des Antikörpers an die Antigenbindungsstelle des Rezeptors die Antigenbindung simuliert. Eine solche Stimulation von Lymphozyten durch Anti-Ig-Antikörper wurde für B-Zellen mehrfach nachgewiesen (178,179).

Als Modell für die funktionelle Untersuchung der Anti-μ Antikörper sollte der Einfluß auf die Alloantigen-Erkennung der T-Lymphozyten in der MLC und in der CMC (siehe IV, 7.) bestimmt werden.

Wurden einem MLC-System (C57/bl →DBA) die Responderzellen mit Hühner-Antikörpern gegen IgM p.c. vorinkubiert, so war eine eindeutige Inhibition von etwa 75 % der Alloantigen-Stimulation zu beobachten. Eine Inhibition dieser Höhe trat sowohl nach Inkubation mit komplettem αIgM-Antiserum als

auch mit affinitätschromatographisch gereinigten Hühner-Antikörpern gegen IgM p.c. oder mit Antikörpern gegen isolierte μ-Ketten auf. Eine Absorption des Hü αIgM p.c.-AS mit Sepharose-gebundenem Maus-IgG hatte keinen Einfluß auf die MLC-Inhibition.

Nur einen geringen Effekt (bis zu 10 % Inhibition) hatten die als Kontrollen verwendeten Hühner-Antiseren gegen Myelom-κ-Ketten der Maus und gegen Rinderserumalbumin.

Diese Inhibition der MLC-Stimulation läßt eine Bindung der Hühner-AK an Determinanten auf oder nahe bei den Alloantigenrezeptoren vermuten.

Wie gereinigte Anti-IgM p.c.-Antikörper inhibierten auch Kaninchen-Anti IgM p.c.-Antiseren die MLC zu etwa 65 %, obwohl sie in der Radioautographie keine Bindung an T-Zellen erkennen ließen. Eine plausible Erklärung für diesen Befund läßt sich derzeit nicht geben.

Statt einer Inhibition zeigten dagegen affinitätschromatographisch gereinigte Hühner-AK gegen Maus IgG und $F(ab')_2$-Fragmente von Maus IgG in einigen Experimenten eine Steigerung des ^3H-Thymidineinbaus bis zum fünffachen der normalen Stimulation.

Die Inhibition von MLC mit Antikörpern hat sich nach der vorliegenden Literatur als außerordentlich schwierig erwiesen. Ein Grund dafür ist in der Komplexität der ablaufenden Reaktionen zu suchen, bei denen die spezifische Antigenerkennung nur der erste Schritt einer Reihe von Zellinteraktionen und weitgehend unbekannten Vorgängen in der stimulierten Zelle darstellt.

Die Anfälligkeit der MLC wird erhöht durch die Laufzeit des Tests über mehrere Tage sowie ihre Sensitivität gegenüber unspezifischen Störfaktoren wie z.B. heterologe Serumproteine (180). Weiter ist bekannt, daß Antikörperkomplexe mit den Rezeptoren von B-Lymphozyten (181) und T-Lymphozyten (131, 144,153) rasch von den Zellen abgestoßen ("shedding") oder via Endozytose in das Zytoplasma aufgenommen werden können.

Die Rezeptoren werden innerhalb weniger Stunden wieder erneuert.

Die kurze Halbwertszeit des an den Membranrezeptor gebundenen AK könnte dafür verantwortlich sein, daß trotz nachweislich bindender Antikörper keine Inhibition nachzuweisen ist.

Die in der Literatur beschriebenen Versuche von Cerottini et al. (119), Koch et al. (165) und Brondz (166), MLC oder CMC mit Antiseren gegen konstante Regionen von Immunglobulinen zu inhibieren, hatten alle keinen Erfolg. Dagegen war die Inhibition der MLC (Binz et al. (176)) und von MLC und CMC (Wight et al. (177)) möglich, wenn antiidiotypische Antiseren zusammen mit Komplement zur Vorinkubation der Responderzellen verwendet wurden.

Die Verwendung von Komplement bei der Vorinkubation der Responder-Zellen zerstört allerdings alle Zellen, die von den eingesetzten Antikörpern erkannt werden. Dadurch wird eine Aussage über die funktionelle Bedeutung der erkannten Moleküle erschwert, da auch die Antikörper, die an Zelloberflächenproteine ohne funktionelle Bedeutung für die MLC oder CMC-reaktiven Zellen gebunden waren, für die "Inhibition" der getesteten Funktion sorgen können.

Eine rigorose Kontrolle der Spezifität der verwendeten Antikörper schien deshalb bei diesem Versuchsansatz von entscheidender Bedeutung.

Wenn auch der hier beschriebene Ansatz der MLC-Inhibition mit blockierenden Anti-IgM-Antikörpern einleuchtend zu sein schien, so zeigte sich bei der Durchführung und Bewertung der Experimente, daß auf Grund der komplexen MLC-Reaktivitäten und der Interaktion von Helfer- und/oder Supressorzellen sowie der von diesen Zellen gebildeten Faktoren eine eindeutige Aussage nicht möglich war. Weitere systematische Studien unter Berücksichtigung von funktionell verschiedenen Zell-Subpopulationen sind nötig, um diese Frage beantworten zu können.

7. CML-Inhibitonsversuche mit Hühner-Antiseren und gereinigten Antikörpern gegen Maus IgM und IgM-Fragmente

Bei der proliferativen Antwort auf Alloantigenstimulation (in der MLC) entwickelt eine T-Lymphozyten-Population die Fähigkeit zur spezifischen Zytolyse. Auf solchen MLC-induzierten T-Lymphoblasten, die Vorläufer der zylotoxischen T-Zellen darstellen (153), waren mittels Immunpräzipitation "IgT"-Moleküle nachweisbar (siehe III, 6.).

Inwieweit diese Moleküle funktionell für die Zytolyse von Bedeutung sind, sollte durch Inhibitionsexperimente mit Hühner-Antikörpern untersucht werden.

Dazu wurden die "Killer"-Zellen mit Hühner-AS und -AK gegen Maus IgM, μ und Fdμ vorinkubiert. Die Antikörper verblieben (allerdings verdünnt durch die zugegebene Zielzellen-Suspension) im Testansatz, um eine Dissoziation zu erschweren.

Der erwarteten Inhibition der zytolytischen Aktivität lag die Hypothese zugrunde, daß durch die Antikörper-Vorinkubation der Effektorzellen die für die Alloantigen-Erkennung verantwortlichen Rezeptoren "abgedeckt" wurden.

Bei Vorinkubation mit kompletten Hühner-AS gegen IgM p.c. konnte die Zytotoxizität zu etwa 60 % inhibiert werden. Die Absorption des AS mit Erythrozyten reduzierte den Inhibitionseffekt nicht wesentlich (50 %). Wurden jedoch aus dem Antiserum affinitätschromatographisch AK gegen IgM p.c. gereinigt, so konnte mit diesen AK die Zytotoxizität fast vollständig (91 %) blockiert werden.

Eine Absorption der Hü αIgM p.c.-Antikörper mit Maus IgG, wobei Antikörper mit Spezifitäten gegen leichte Ketten und gegen γ-Ketten entfernt wurden, verringerte den Inhibitionseffekt auf etwa die Hälfte (von 91 % auf 45 % Inhibition). Wurden diese Antikörper noch mit Schaf- und Mauserythrozyten absorbiert, verblieben noch etwa 30 % CMC-Inhibition im Vergleich zu einem Hühner Anti KLH-Antikörper, der in gleicher Weise absorbiert worden war.

Von den Hühnerantiseren gegen isolierte μ-Ketten und Fdμ-Fragmente zeigten zwar drei Antiseren Inhibitionseffekte in der CML-Reaktion, die jedoch weder in der γ-Globulin-Fraktion dieser Antiseren nach Na_2SO_4-Präzipitation noch in den affinitätschromatographisch gereinigten und mit Erythrozyten absorbierten Antikörpern nachweisbar waren.

Weiter wurde versucht, entsprechend dem Ansatz von Wight et. al. (177) (siehe auch IV, 6.) durch Zugabe von Komplement zu der Antikörper-Vorinkubation der Effektorzellen eine CMC-Inhibition zu erreichen. Mit Hühner-Anti μ-Antikörpern konnte dadurch die Inhibition von etwa 30 % auf etwa 40 % gesteigert werden.

Die unwesentliche Erhöhung der Inhibitionskapazität durch Zugabe von Komplement läßt darauf schließen, daß die Dissoziation der Antikörper von den Effektorzellen während der Testinkubation keinen wesentlichen Einfluß auf die Inhibition hat. Das "Festhalten" der Vorinkubationssituation durch die Komplement-Lyse des Großteils der Zellen, auf die AK gebunden waren, spricht gegen die reine "Abdissoziation" der AK ebenso wie die relativ kurze, 30 - 40 min dauernde "Erkennungsphase" gleich zu Beginn der zytolytischen Reaktion (182), die durch Anti-Rezeptor-Antikörper inhibierbar sein sollte.

Die beschriebene Verringerung der Inhibition von 90 % auf 45 % durch Absorption des Anti-IgM-Antikörpers mit Maus IgG könnte mit der Entfernung von Antikörperspezifikaten gegen L-Ketten (neben Anti γ-spezifischen AK) erklärt werden.

Völlig unklar ist zur Zeit, ob den von Anti-L-Ketten-AK abgedeckten Determinanten eine besondere Bedeutung für die Rezeptor-Funktionen zytolytischer T-Zellen zukommt. Im Gegensatz zu diesen funktionellen Befunden in der CMC konnten weder im Bindungsverhalten auf T-Lymphozyten (IF-Tests) noch in den Immunpräzipitationen deutliche Unterschiede zwischen Antikörpern mit IgM-Spezifität und μ-Spezifität gefunden werden. Auch in den MLC-Inhibitionsversuchen hatte die Absorption des (hier allerdings kompletten) Anti-IgM-Antiserums

mit Maus IgG keinen Effekt auf die vorhandene Blockierung der MLC-Reaktivität.

Ein interessanter Zusammenhang mit Befunden von Lonai et al. (167) scheint dabei möglich. Sie versuchten, mit Hilfe von Antikörpern gegen die variablen Domänen leichter Ig-Ketten (V_L) die Antigenbindung von T-Lymphozyten zu inhibieren. Dabei fanden sie, daß Anti V_L-Antikörper nur auf einer Subpopulation von T-Zellen inhibierten, die die Oberflächen-Marker von zytotoxischen T-Zellen und von Suppressor-T-Zellen trugen. Anti V_H-Antikörper (mit Spezifität für die variable Domäne schwerer Ketten) banden dagegen nur auf T-Zellen mit dem Oberflächenmarker von Helfer T-Zellen.

Falls Anti V_L-Antikörperspezifitäten für den Großteil des Inhibitionseffekts der Anti IgM p.c.-Antikörper in der CMC verantwortlich sind, müßte für die Anti-μ- und Fdμ-Antikörper gefordert werden, daß sie nur zu einer geringen CMC-Inhibition führen können.

Dies scheint der Fall zu sein, denn die affinitätschromatographisch gereinigten Anti-Fragment-Antikörper hatten keine Wirkung auf die CMC.

Wegen der deutlich niedrigeren Titer dieser AS und AK in der passiven Hämagglutination scheint aber auch ungenügende Bindung oder frühzeitige Dissoziation von den Rezeptorstrukturen eine Möglichkeit, die negativen Ergebnisse zu erklären.

Denkbar wäre auch eine Verdrängung der Hühnerantikörper von den T-Zell-Rezeptoren durch vielleicht mit größerer Avidität gebundene Alloantigene der Zielzellen.

Das Fehlen der Inhibition der Anti IgM-Fragment-AK im Gegensatz zu den Anti IgM p.c.-AK könnte auch mit dem Ausschluß von kontaminierenden Zelloberflächenstrukturen in den zur Immunisierung verwendeten isolierten μ-Ketten und Fdμ-Fragmenten erklärt werden. Damit wäre allerdings die gesamte Inhibitionskapazität der Hühner Anti-IgM AK auf Aktivitäten gegen geringste Kontaminationen in den IgM p.c.-Präparationen zurückzuführen, die möglicherweise generell auf kernhaltigen Zellen vorkommen.

Dagegen sprechen jedoch die Ergebnisse der Immunpräzipitation. Hier konnte auf allen untersuchten T-Zellpopulationen vor allem "IgT" und (höchstwahrscheinlich) Aktin-Moleküle nachgewiesen werden, unabhängig davon, ob Antikörper gegen möglicherweise verunreinigtes IgM p.c. oder gegen Fdμ verwendet wurden, das mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht mit anderen Proteinen kontaminiert war.

Formal auszuschließen ist diese Erklärungsmöglichkeit jedoch nicht, ebensowenig wie die Annahme von kreuzreagierenden ubiquitären Determinanten in unmittelbarer Nähe des Rezeptors, die mit Erythrozyten nicht absorbierbar sind.

Die vorgestellten Daten lassen einen Zusammenhang zwischen der Effektorfunktion zytotoxischer T-Zellen und den erkannten "IgT"-Molekülen vermuten. Eine Aussage über die mögliche Identität des von den Hühner-Antikörpern erkannten Oberflächenmoleküls mit dem funktionellen Alloantigen-Rezeptor sollten weitere Studien ermöglichen, in denen die Inhibition der Antigenbindung von z.B. Hapten-spezifischen zytolytischen T-Zellen auf dem Einzelzellniveau genauer untersucht werden kann.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Anwesenheit von endogenem Immunglobulin (Ig) oder verwandten Molekülen auf der Oberfläche von T-Lymphozyten ist weiterhin umstritten, insbesondere, wenn in den Untersuchungen Säugetier-Antiseren verwendet wurden. Anti-Ig-Antikörper aus Vögeln dagegen erwiesen sich als geeigneter. Möglicherweise erlaubt den Vögeln der große phylogenetische Abstand die Erkennung von Determinanten, die den Säugern gemeinsam sind und die sowohl auf B-Zell-Ig als auch auf den T-Zell-Rezeptoren vorkommen.

Da die Daten verschiedener Arbeitsgruppen auf eine Strukturanalogie des T-Zell-Rezeptors mit monomerem IgM hindeuten und zudem auf B-Lymphozyten Membran IgM am häufigsten zu finden ist, wurden in der vorliegenden Arbeit Antiseren gegen IgM hergestellt. Die Immunisierung mit μ-Ketten-Fragmenten sollte die Chance erhöhen, Antikörper gegen die variable Domäne der schweren Kette zu erzeugen.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb neben Kaninchen-Antiseren vor allem Hühner-Antiseren induziert. IgM wurde aus normalem Maus Serum affinitätschromatographisch isoliert. Schwere Ketten des IgM-Moleküls (μ-Ketten) und durch Papainverdauung von IgM erzeugte Bruchstücke der μ-Ketten wurden mit Hilfe der präparativen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) gereinigt. Als Papain-Hauptfragmente der μ-Ketten traten zwei Fdμ-Bruchstücke mit einem apparenten Molekulargewicht von 26 000 d und 44 000 d auf. Sie stellen die aminoterminalen zwei bzw. drei Domänen der μ-Kette dar und sind im nativen Zustand mit leichten Ketten assoziiert.

Um Kreuzreaktionen über gemeinsame Kohlenhydratanteile von IgM und Zelloberflächen-Molekülen zu vermeiden, wurden auch Perjodat-oxidierte Antigene zur Immunisierung eingesetzt.

Die Antiseren wurden mit Erythrozyten, einer Maus-Mastozytomlinie und mit Tuberkelbakterien absorbiert. Gereinigte Antikörper (AK) wurden affinitätschromatographisch an insolubi-

lisiertem IgM präpariert und im Fall der Anti IgM-AK μ-spezifisch gemacht durch Absorption mit Maus-IgG und Maus-Serumproteinen.

Mit den Kaninchen Anti IgM-AK konnte in der empfindlichen Zyto-Radioautographie keine Reaktion mit T-Lymphozyten der Maus gefunden werden, während die aus Hühner Anti-IgM Antiserum isolierten Anti IgM- und Anti-μ AK an etwa 60 % der peripheren T-Zellen gebunden wurden.

In der indirekten Immunfluoreszenz färbten gereinigte Hühner Anti-μ-spezifische AK und gereinigte Hühner-AK gegen ein Perjodat-oxidiertes Fdμ-Fragment mit dem MG von 26 000 d ($Fd\mu 26000_{ox}$) sowohl die meisten der B-Lymphozyten als auch etwa 60 % der peripheren T- und 90 % der T-Lymphomzellen an.

Auf Thymozyten dagegen zeigte der Anti-μ AK nur eine sehr geringe Bindung (7 %), während der Anti $Fd\mu 26000_{ox}$-AK etwa 75 % der Thymozyten anfärbte.

Zur näheren Charakterisierung der erkannten Zelloberflächenmoleküle wurden die T-Zell-Oberflächen mit Hilfe von Laktoperoxidase radiojodiert. Die Detergens-Lysate der Zellen wurden mit Hühner-Antikörpern gegen IgM, μ und Fdμ präzipitiert und die Immunpräzipitate in der SDS-Disk-PAGE analysiert.

Im Gegensatz zu den B-Zellen, auf deren Oberfläche neben L-Ketten sowohl μ- als auch δ-Ketten gefunden wurden, konnte auf peripheren T-Zellen, Thymozyten, MLC-induzierten T-Blasten und T-Lymphomzellen der Linie WEHI 22 nur eine schwere Kette mit geringfügig aber signifikant höherer Mobilität als μ-Ketten (Molekulargewicht 70 000 d) sowie mit leichten Ketten komigrierende Moleküle nachgewiesen werden. Zusätzlich trat in allen Präzipitaten eine Bande bei 35 - 45 000 d auf, die höchstwahrscheinlich von Aktin gebildet wird. Die Analyse der Immunpräzipitate unter nicht-reduzierenden Bedingungen zeigte eine Hauptbande bei 130 - 140 000 d.

Diese Ergebnisse lassen sich am ehesten im Sinne des "IgT"-Modells nach Moseley und Marchalonis deuten, das zwei kovalent verbundene schwere Ketten mit etwa 70 000 d postuliert.

Daran sind leichte Ketten mit einem Molekulargewicht von etwa 25 000 d nicht-kovalent assoziiert.

Eine mögliche Rezeptor-Funktion dieser erkannten Oberflächen-Strukturen wurde in Experimenten zur Inhibition der Alloantigen-Erkennung in der gemischten Lymphozytenkultur (MLC) und der zellvermittelten Zytotoxizität (CMC) getestet. In beiden Systemen konnte eine Inhibition mit gereinigten Hühner-AK gegen Maus IgM (MLC: 75 %, CMC: 90 %) und mit μ-Spezifität (MLC: 75 %, CMC: 45 %) demonstriert werden. Diese Ergebnisse lassen einen Zusammenhang zwischen dem von den Hühner AK erkannten Zelloberflächenmolekülen und funktionellen Antigenrezeptoren auf T-Zellen vermuten.

Die Herkunft dieser T-Zell-Oberflächenmoleküle bleibt unklar, obwohl der Nachweis dieser Moleküle auf in vitro kultivierten T-Lymphomzellen zusammen mit dem von Serum-Immunglobulinen abweichenden Molekulargewicht der schweren Kette auf eine endogene Synthese hindeuten.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Ehrlich, P., Proc. R. Soc. Lond. Ser. B 65, 424 (1900)

2. Edelman, G.M., Gall, W.E., The antibody problem, Annu. Rev. Biochem. 38, 415 (1969)

3. Inbar, D., Hochmann, I., Givol, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2659 (1972)

4. Gally, J.A., Edelman, G.M., Annu. Rev. Gent. 6, 1 (1972)

5. Warner, N.L., ADV. Immunol. 19, 67 (1974)

6. Ada, G.L., Ey, P.L. (1975) The Antigens (ed. Sela, M.) Vol. 3, p. 190 (1975) Academic Press, New York

7. Vitetta, E.S., Uhr, J.W., Transpl. Rev. 14, 50 (1973)

8. Marchalonis, J.J., Cone, R.E., Transpl. Rev. 14, 3 (1973)

9. Pernis, B., Membrane Receptors of Lymphocytes, eds. Seligman, M., Preud'homme, J.L., Kourilsky, F.M. (1975), North Holland, Amsterdam

10. Lisowska-Bernstein, B., Rinny, A., Vasath, P., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2829 (1973)

11. Melcher, U., Vitetta, E.S., Mc-Wiliams, M., Lamm, M.P., Philips-Wualiata, J.M., Uhr, J.W., J. Exp. Med. 140, 1427 (1973)

12. Wigzell, H., Contemp. Topics Immunobiol. 3, 77 (1973)

13. Jerne, N.K., Proc. Nat. Acad. Sci. 41, 849 (1955)

14. Eichmann, K., Eur. J. Immunol. 4, 296 (1974)

15. Eichmann, K., Rajewsky, K., Eur. J. Immunol. 5, 661 (1975)

16. Abney, E.R., Cooper, M.D., Kearney, J.F., Lawton, A.R., Parkhouse, R.M.E., J. Immunol. 120, 2041 (1978)

17. Roelants, G.E., in Molecular Approaches to Immunology (eds. Smith, E.E., Ribbons, D.W.), Academic Press, New York (1975)

18. Grey, H.M., Colon, S., Solomon, A., Mc Laughlin, C.L., J. Immunol. 111, 1923 (1973)

19. Rajewsky, K., Mohr, R., Eur. J. Immunol. 4, 111 (1974)

20. Santana, V., Wedderburn, N., Turk, J.L., Immunology 27, 65 (1974)

21. Goldschneider, J., Cogen, R.B., J. Exp. Med. 138, 163 (1973)

22. Pernis, B., Miller, J.F.A.P., Forni, L., Sprent, J., Cell Immunol. 10, 476 (1974)

23. Bankhurst, A.D., Warner, N.L., Sprent, J., J. Exp. Med. 134, 1005 (1971)

24. Nossal, G.J.V., Warner, N.L., Lewis, H., Sprent, J., J. Exp. Med. 135, 405 (1972)

25. Boylston, A.W., Immunology 24, 851 (1973)

26. Hudson, L., Thantrey, N., Roitt, J.M., Immunology 28, 151 (1975)

27. Hämmerling, U., Mack, C., Pickel, H.G., Immunochemistry 13, 525 (1976)

28. Hämmerling, U., Rajewsky, K., Eur. J. Immunol. 1, 447 (1971)

29. Burckhardt, J.J., Guggesberg, F., von Fellenberg, R., Immunology 26, 521 (1974)

30. Marchalonis, J.J., Cone, R.E., Atwell, J., J. Exp. Med. 135, 956 (1972)

31. Cone, R.E., Marchalonis, J.J., Biochem. J. 140, 345 (1974)

32. Boylston, A., Mowbray, J.M., Immunology 27, 855 (1974)

33. Misra, D.N., Ladoulis, C.T., Gill, T.J., Fed. Proc. 34, 553 (1975)

34. Haustein, D., Marchalonis, J.J., Crumpton, M.J., Nature 252, 602 (1974)

35. Hämmerling, U., Pickel, H.G., Mack, C., Masters, D., Immunochemistry 13, 533 (1976)

36. Haustein, D., Goding, J.W., Biochem. Biophys. Res. Comm. 65, 483 (1975)

37. Rieber, E.P., Riethmüller, G., Z. Immun. Forsch. exp. Ther. 147, 276 (1974)

38. Chavin, S.J., Biochem. Biophys. Res. Comm. 61, 382 (1974)

39. Vitetta, E.S., Bianco, C., Nussenzweig, V., Uhr, J.W., J. Exp. Med. 136, 81 (1972)

40. Grey, H.M., Kubo, R.T., Cerottini, J.C., J. Exp. Med. 136, 1323 (1972)

41. Jensenius, J.A., Williams, A.F., Eur. J. Immunol. 4, 98 (1974)

42. Benaceraff, B., McDevitt, H.O., Science 175, 273 (1972)

43. Katz, D., Benaceraff, B., Transplantn. Rev. 22, 175 (1975)

44. Shevach, E.M., Green, J., Paul, W.E., J. Exp. Med. 139, 679 (1974)

45. Munro, A.J., Taussig, M.J., Nature 256, 103 (1975)

46. Tada, T., Taniguchi, M., Takemori, T., Transplantn. Rev. 26, 106 (1975)

47. Tada, T., Taniguchi, M., David, C.S., J. Exp. Med. 144, 713 (1976)

48. Takemori, T., Tada, T., J. Exp. Med. 142, 1241 (1975)

49. Taniguchi, T., Hayakawa, K., Tada, T., J. Immun. 116, 542 (1976)

50. Taussig, M.J., Nature 248, 234 (1974)

51. Taussig, M.J., Munro, A.J., Cambell, R., David, C.S., Stains, N.A., J. Exp. Med. 142, 694 (1976)

52. Hopper, J.E., Nisonoff, A., Adv. Immunol. 13, 58 (1971)

53. Binz, H., Wigzell, H., J. Exp. Med. 142, 197 (1975)

54. Elves, M.V., Transplantation 16, 403 (1973)

55. Joller, Nature New Biol. 240, 213 (1972)

56. McKearn, T.J., Science 183, 94 (1974)

57. McKearn, T.J., Hamada, Y., Stuart, F.P., Fitch, F.W., Nature 251, 648 (1974)

58. Eichmann, K., Rajewsky, K., Eur. J. Immunol. 5, 661 (1975)

59. Binz, H., Wigzell, H., Bazin, H., Nature 264, 639 (1976)

60. Eichmann, K., Bereck, C., Eur. J. Immunol. 3, 599 (1973)

61. Eichmann, K., Immunogenetics 2, 491 (1975)

62. Black, S.J., Eichmann, K., Hämmerling, G.J., Rajewsky, K., in Seligmann, Prend'homme, Kourilsky "Membrane Rezeptors of Lymphocytes" p. 117, North Holland, Amsterdam (1975)

63. Hämmerling, G.J., Black, S.J., Berek, C., Eichmann, K., Rajewsky, K., J. Exp. Med. 143, 861 (1976)

64. Binz, H., Wigzell, H., Scand. J. Immun. 5, 559 (1976)

65. Binz, H., Wigzell, H., Contemp. Topics Immunobiol. 7, 111 (1977)

66. Loor, F., Prog. Allergy 23, 40 (1977)

67. Robinson, E.A., Appella, E., McIntire, K.R., J. Biol. Chem. 248, 7112 (1973)

68. Rodbard, D., Crambach, A., Proc, Nat. Acad. Sci. USA 65, 970 (1970)

69. Tonegawa, S., Hozumi, N., Matthyssens, G., Schuller, R., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41, 877 (1976)

70. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, J. Biol. Chemistry 193, 265 (1951)

71. Ouchterlony, O., Prog. Allergy 6, 30 (1962) Karger, Basel

72. Schneidegger, J.J., Int. Arch. Allergy 7, 103 (1955)

73. Laemmli, U.K., Nature 227, 680 (1970)

74. Dulaney, J.T., Touster, O., Biochim. Biophys. Acta 196, 29 (1970)

75. Laskey, R.A., Mills, A.D., FEBS-Letters 82, 314 (1977)

76. Weber, K., Osborn, M., J. Biol. Chem. 244, 4406 (1969)

77. March et al., in: Affinity chromatography, Journal of Chromato-raphy, J. Turkova, ed., Vol. 12, 166 (1978) Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing Company

78. Porath et al., in: Affinity chromatography, Journal of Chromatography, J. Turkova, ed., Vol. 12, 165 (1978) Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing Company

79. Travis, J., Pannel, R., Behring Inst. Mitteilungen 54, 30 (1974)

80. Lind, J., Live, J., Mansa, B., Pathol. Microbiol. Scand. 78, 673 (1970)

81. Kekwick, R.A., Biochem. J. 34, 1248 (1940)

82. Heide, K., Schwick, H.G., in: Immunochemistry, Weir, D.M., ed., Vol. 1, 7.5 (1978) Blackwell Scientific Publications, Oxford

83. Dunn, T.B., Potter, M., J. Nat. Cancer Inst. 18, 587 (1957)

84. Maurer, A. (ed.) Electrophoresis and Isoelectric Focusing in Polyacrylamidgels, p. 189 (1974)

85. Ziola, B.R., Scraba, D.G., Analytical Biochemistry 72, 366 (1976)

86. Weber, K., Kuzer, O.J., J. Biol. Chem. 246, 4504 (1971)

87. Milstein, C.P., Richardson, N.E., Deverson, E.V., Feinstein, A., Biochem. J. 151, 615 (1975)

88. Herd, Z.L., Ada, G.L., Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 47, 63 (1969)

89. Bennet, J., Methods in Enzymology XI, 227 (1967)

90. Arnon, R., Methods in Enzymology XIX, 226 (1970)

91. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., Anal. Chemistry 28, 350 (1956)

92. Goding, J.W., J. Immunol. Meth. 10, 61 (1976)

93. Krammer, P., J. Exp. Med. 147, 25 (1978)

94. Julius, M., Simpson, H.E., Herzenberg, L.A., Eur. J. Immunol. 3, 645 (1973)

95. Harris, A.W., Bankhurst, A.D., Mason, S., Warner, N.L., J. Immunol. 110, 431 (1973)

96. Kay, H.D., Bonnard, G.D., West, H.W., Herbermann, R.B., J. Immunol. 118, 2058 (1977)

97. Stein, S.R., Palmer, J.L., Nisonoff, J. Biol. Chem. 239, 2872 (1964)

98. Hadam, M., pers. Mitteilung

99. Akiyoshi Kawamura, J. (ed.) Fluorescent Antibody techniques and their applications. University of Tokyo press (1977)

100. Philipps, O.R., Morrison, M., Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 284 (1970)

101. Marchalonis, J.J., Cone, R.E., Santer, V., Biochem. J. 124, 921 (1971)

102. Baur, S., Vitetta, E.S., Sherr, C.J., Schenklein, J., Uhr, J.W., J. Immunol. 106, 1133 (1971)

103. Haustein, D., J. Immunol. Methods 7, 25 (1975)

104. Morrison, M., Hultquist, D.E., J. Biol. Chem. 238, 2847 (1963)

105. Wernet, P., pers. Mitteilung

106. Vitetta, E., pers. Mitteilung

107. Rieber, E.P., Riethmüller, G., Z. Immun.-Forsch. 147, 262

108. Hubbard, A.L., Cohn, Z.A., J. Cell Biol. 64, 438 (1975)

109. Goding, J.W., J. Immunol. Meth. 20, 241 (1978)

110. Brunda, M.J., Minden, P., Sharpton, T.R., McClatchy, J.K., Farr, R.S., J. Immunol. 119, 193 (1977)

111. Barkas, T., Watson, M.J., Immunology 36, 557 (1979)

112. Kessler, S.W., J. Immunol. 115, 1617 (1975)

113. Kessler, S.W., J. Immunol. 117, 1482 (1976)

114. Ey, P.L., Prowse, S.J., Jenkin, C.R., Immunochemistry 15, 429 (1978)

115. Hunter, W.M., Greenwood, F.C., Nature 194, 495 (1962)

116. Benson, H.N., Brumfield, H.P., Pomeroy, B.S., J. Immunol. 87, 616 (1961)

117. Stolfi, R.L., Fugman, R.A., Jensen, I.I., Sigel, M.M., Immunology 20, 299 (1971)

118. Terasaki, P., Benoco, D., Park, M.S., Ozturk, G., Iwani, Y., Am. J. Clin, Pathol. 69, 103 (1978)

119. Cerottini, I.C., Brunner, K.T., Advan. Immunol. 18, 67 (1974)

120. Wagner, H., Feldman, M., Cell. Immunol. 3, 405 (1972)

121. Häry, P., Defendi, V., Science 168, 133 (1970)

122. Cone, R.E., Brown, W.C., Immunochemistry 13, 571 (1976)

123. Marchalonis, J.J., Edelmann, G.M., J. Exp. Med. 122, 601 (1965)

124. Warner, N.L., Byrt, P., Ada, G.L., Nature 226, 942 (1970)

125. Mattes, M.J., Steiner, L.A., Nature 273, 761 (1978)

126. Merler, E., Gatien, J., De Wilde, G., Nature 251, 562 (1974)

127. Ivanyi, J., Strudwick, L., Makings, C., Eur. J. Immunol. 7, 204 (1977)

128. Avrameas, S., Hösli, P., Stanislawski, M., Rodrigot, M., Vogt, E., J. Immunol. 122, 648 (1979)

129. Hämmerling, U., Mack, D., Pickel, H., Immunochemistry 13, 525 (1976)

130. Williamson, A.R., Ann. Rev. Biochem. 45, 467 (1976)

131. Szenberg, A., Marchalonis, J.J., Warner, N.L., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 2113 (1977)

132. Warr, G.W., Marton, G., Szenberg, A., Marchalonis, J.J., Immunochemistry 15, 615 (1978)

133. Delovitch, T.L., Fegelman, A., Barber, B.H., Frelinger, I.A., J. Immunol. 122, 326 (1979)

134. Fechheimer, M., Daiss, J.L., Cebra, J.I., Molecular Immunology 16, 881 (1979)

135. Braun, I., Fujiwara, K., Pollard, T.D., Unanue, E.R., J. Cell Biol. 78, 409 (1978)

136. Mescher, M.F., Pollock, R.R., J. Immunol. 123, 1155 (1979)

137. Nagy, Z., Elliot, B.E., Nabholz, M., Krammer, P.H., Pernis, B., J. Exp. Med. 143, 648 (1976)

138. Van Boxel, I.A., Rosenstreich, D.L., J. Exp. Med. 139, 1002 (1974)

139. Kincade, P.W., Lawton, A.R., Cooper, M.D., J. Immunol. 106, 1421 (1979)

140. Webb, S.R., Cooper, M.D., J. Immunol. 111, 275 (1973)

141. Jensenius, I.C., Crone, M., Koch, C., Scand. J. Immunol. 4, 151 (1975)

142. Haustein, D., Marchalonis, J.J., Harris, A.W., Biochemistry 14, 1826 (1975)

143. Potter, M., Physiol. Reviews 52, 631 (1972)

144. Marchalonis, J.J., Bucana, C., Hoyer, L., Warr, G.W., Hanna, M.G., Szenberg, A., Science 199, 433 (1978)

145. Singh, G., Bazin, H., Ladoulis, C.T., Molecular Immunology 16, 755 (1979)

146. Misra, D.N., Gill, T.J., Molecular Immunology 16, 465 (1979)

147. Clamp. J.R., Hough, L., Biochem. J. 94, 17 (1965)

148. Andersen, J. Immunol. 97, 913 (1966)

149. Miller, R.G., in "In Vitro Methods in Cell-Mediated and Tumor Immunity", Bloom, B.R., David, J.R. (eds.) p. 283 (1976), Academic Press

150. Andersson, L.C., Häyry, P., Transplant. Rev. 25, 121 (1975)

151. Rygaard, J., in "The nude Mouse" (eds. Fogh, J. and Giovanella, B.) p. 95, Academic Press, N.Y., 1978

152. Kleinschmidt, A., Diplomarbeit (1979) Fachbereich Biologie, Universität Tübingen

153. Cantor, H., Boyse, E.A., J. Exp. Med. 141, 1376 (1975)

154. Mosier, D.E.
J. Immunol. 112, 305 (1974)

155. Marchalonis, J.J., in "Contemporary Topics in Immunobiology, Band 9, Seite 255 (1980)

156. Abel, C.A., Grey, H.M., Biochemistry 7, 2682 (1968)

157. Heremans, J.F., Heremans, M.Th., Acta Med. Scand. Suppl. 367, 27 (1961)

158. Mannik, M., J. Immunol. 99, 899 (1967)

159. Tomasi, T.B., Hauptmann, S.P., J. Immunol. 112, 2274 (1974)

160. Reth, M., Imanishi-Kari, T., Rajewsky, K., Eur. J. Immunol. 9, 1004 (1979)

161. Haustein, D., Marchalonis, J.J., Harris, A.W., Biochemistry 14, 1826 (1975)

162. Moseley, J.M., Beatty, E.A., Marchalonis, J.J., J. of Immunogenetics 6, 1 (1979)

163. Yamaga, K.M., Kubo, R.T., Etlinger, H.M., J. Immunol. 120, 2068 (1978)

164. Binz, H., Frischknecht, H., Mercolli, C., Wigzell, H., Scand. J. Immunol. 7, 481 (1978)

165. Koch, C., Nielsen, H.E., Scand. J. Immunol. 2, 1 (1973)

166. Brondz, B.D., Transplant. Rev. 10, 112 (1972)

167. Lonai, P., Ben-Neriah, Y., Steinmann, L., Givol, D., Eur. J. Immunol. 8, 827 (1978)

168. Moseley, J.M., Marchalonis, J.J., Harris, A.W., Pye, J., J. Immunogenetics 4, 233 (1977)

169. Warr, G.W., in "Contemporary Topics in Immunobiology" Vol. 9, 141 (1980) (Marchalonis, J.J. and Cohen N., eds.) Plenum Press, New York

170. Storb, U.,
Proc. Nat. Acad. Sci USA 75, 2905 (1978)

171. Warner, N.L., Marchalonis, J.J., J. Immunol. 109, 657 (1972)

172. Vaerman, J.P., Lebacq-Verheyden, A.M., Heremans, J.F., Immunol. Commun. 3, 239 (1974)

173. Jerry, L.M., Kunkel, H.G., Grey, H.M., Proc. Natl. Acad. Sci. 65, 557 (1970)

174. Julius, M.H., Cosenza, H., Augustin, A.A., Eur. J. Immunol. 8, 484 (1978)

175. Krawinkel, U., Cramer, M., Kindred, B., Rajewsky, K., Eur. J. Immunol. 9, 815 (1979)

176. Binz, H., Askonas, B.A., Eur. J. Immunol. 5, 618 (1975)

177. Wight, E., Binz, H., Scand. J. Immunol. 6, 959 (1977)

178. Parker, D.C., Nature 258, 361 (1975)

179. Sieckmann, D.G., Scher, J., Asowsky, R., Mosier, D.E., Paul, W.E., J. Exp. Med. 148, 1628 (1978)

180. Meo, T., "Immunological Methods" (Lefkovits, J. and Permis, B., eds.), p. 227, Academic Press, New York (1979)

181. Taylor, R.B., Dufus, P.H., Nature New Biol. 233, 225 (1971)

182. Golstein, P., Smith, E.T., Contemp. Topics in Immunobiol. 7, 273 (1977)

183. Moseley, J.M., Beatty, E.A., Marchalonis, J.J., Journal of Immunogenetics 6, 19 (1979)

184. Strominger, J.L., Humphreys, R.E., McCune, M.M., Parham, P., Robb, R., Springer, T., Terhorst, C., Fed. Proc. 35, 1177 (1976)

185. Vitetta, E.S., Uhr, I.W., Boyse, E.A., J. Immunol. 114, 252 (1975)

Lebenslauf

4. 12. 1946	geboren in Rothenstadt als erster Sohn von Franz und Maria Birke, geb. Wach.
1953 – 1957	Max-Reger-Volksschule, Weiden/Opf.
1957 – 1966	Kepler-Gymnasium, Weiden/Opf.
1966, Juli	Abitur
1966 – 1968	Bundeswehr (Leutnant)
1968 – 1970	Studium der Biologie und Chemie an der Universität Erlangen.
1970 – 1975	Studium der Biochemie an der Universität Tübingen, Institut für Physiologische Chemie und Biochemie.
1971	Eheschließung mit Gudrun Lambel, Geburt unseres Sohnes Oliver.
1975, Januar	Examen, Diplom-Biochemie.
1975, Jan.-Dez.	Diplomarbeit am Institut für Toxikologie und Pharmakologie an der Universität Tübingen, Titel: Naphthalin-Metabolismus in isolierten Hepatozyten unter besonderer Berücksichtigung der Glucuronid-Konjugation von 1,2-Dihydro-1,2-Dihydroxy-Naphthalin und 1-Naphthol (Prof. Dr. K. W. Bock).
1976	Beginn der Promotion in der Abteilung für experimentelle Chirurgie und Immunologie der Chirurgischen Universitätsklinik, Tübingen. Leiter: Prof. Dr. G. Riethmüller. Titel: Antigen-Rezeptoren auf Maus T-Lymphozyten. Versuch einer biochemischen und funktionellen Analyse mit Hilfe von Antikörpern gegen IgM-Determinanten.
1978	Umzug nach München an das Institut für Immunologie der Universität München, Leiter: Prof. Dr. G. Riethmüller.
1979	Geburt unserer Tochter Julika
1979, Juni	Beendigung der Arbeiten an der Dissertation.

Meine wesentlichen akademischen Lehrer:

Biochemie:	Weitzel, Weser, Wendel, Mecke, Probst, Guglielmi, Weber, Hörnle
Physikalische Chemie:	Kortüm, Mauser, Rau, Braun
Organische Chemie:	E. Müller, Bayer, Kraus
Anorganische Chemie:	Rüdorff, Stumpp
Pharmakologie:	Remmer, Bock, Bolt
Physiologie:	Betz, Kissling
Physik:	Krüger
Mathematik:	Schweizer
Mikrobiologie:	Zähner, Dieckmann
Genetik:	Seyffert, Meyer
Botanik:	Metzner
Zoologie:	Grell
Anatomie:	Mörike
Med. Strahlenkunde:	Feine, Kallee
Immunologie:	Riethmüller, Rieber

There is a big jump
from finding something
on the cell surface
and showing that it is
important!

Jan Klein

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (07472) 22145